

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'ENERGIA ELETTRICA E
DELL'INFORMAZIONE "GUGLIELMO MARCONI"

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

TECNICHE DI 3D BIOPRINTING PER LA STAMPA DI TESSUTO CUTANEO

ELABORATO IN BIOMATERIALI

Relatore

Prof. Joseph Lovecchio

Presentata da

Cristian Balducci

Anno Accademico 2019-2020

INDICE

Abstract.....	3
1 Introduzione.....	4
2 Materiali e metodi.....	15
2.1 Tecniche di imaging.....	15
2.2 Le cellule.....	18
2.3 I biomateriali.....	23
2.3.1 I biopolimeri naturali.....	23
2.3.2 I biopolimeri sintetici.....	26
2.3.3 I biopolimeri compositi.....	26
2.4 Il bioink.....	29
2.5 Approccio scaffold-free.....	31
2.6 3D bioprinting.....	32
3 Risultati.....	46
4 Post-processing.....	64
5 Valutazione del prodotto.....	65
5.1 Funzionalità meccaniche.....	66
5.2 Implicazioni in cosmetologia e studi di farmaci.....	68
6 Prospettive future.....	70
6.1 Stampe con vasi sanguigni.....	70
6.2 Stampa con ghiandole sudoripare.....	73
6.3 Le iPSC.....	77
7 Conclusioni.....	80
8 Referenze.....	86

ABSTRACT

Ogni anno 11 milioni di persone necessitano di cure legate alle ustioni il cui trattamento (in caso di lesioni estese) comporta l'asportazione chirurgica della pelle danneggiata e la ricostruzione della lesione con l'aiuto di sostituti della pelle. La creazione di un tessuto cutaneo 3D *in vitro* deve considerare la presenza delle diverse componenti del tessuto nativo (vasi sanguigni ecc.) e delle sue funzioni primarie biologiche e biomeccaniche. Attraverso un adeguato trattamento sarà possibile creare modelli di tessuto malato per studiare patologie come tumori o malattie cutanee. I costrutti potranno essere utilizzati anche per effettuare test *in vitro* di farmaci e cosmetici. Le tecniche tradizionali per realizzarli presentano limiti come l'impossibilità di avere un controllo preciso sulla porosità degli scaffold e sulla distribuzione cellulare in essi, o il rischio di incorrere in stress fisico/chimici sui biomateriali. Possono essere implementate solo *in vitro*. La 3D bioprinting ha le potenzialità per colmare tali limiti, portando ad ottenere un tessuto sempre più fisiologicamente simile a quello nativo e adatto ad essere impiantato. Questa tecnologia gode di altri benefici come la possibilità di stampare costrutti su misura, con struttura identica al sito della ferita e disposizione cellulare omogenea, che consente una maggiore vitalità cellulare in tutte le zone del costrutto. Consente anche una notevole riduzione dei tempi di generazione del costrutto. Vengono presentate le principali tecniche di 3D bioprinting attualmente utilizzate, i metodi di pre- e post-processing, pregi e difetti di ogni tecnica evidenziando i risultati migliori ottenuti con esse. Inoltre, ci si focalizzerà su alcuni lavori presenti in letteratura, che propongono varie modifiche apportate ai bioinchiostri o alle stampanti, per stampare un tessuto cutaneo strutturalmente completo. Si discutono infine le sfide future alle quali si andrà incontro e le innovazioni possibili in questo ambito.

1 INTRODUZIONE

La pelle è l'organo più grande del corpo umano, rappresentando circa il 15% del peso corporeo totale negli adulti e ricopre una superficie di circa 2 m² [1]. Presenta una struttura multistrato altamente complessa, gerarchica e stratificata, formata essenzialmente da tre strati principali che sono: epidermide, derma e ipoderma (detto anche tessuto sottocutaneo). L'epidermide è lo strato più esterno e le cellule che lo compongono in massima parte (95%) sono i cheratinociti (KC) che formano un epitelio stratificato cheratinizzato. La pigmentazione cutanea è fornita in parte dai melanociti che producono melanina per proteggere la pelle dalle radiazioni UV [2].

L'epidermide contiene anche diverse popolazioni minori di cellule, tra cui cellule immunitarie come cellule di Langerhans e cellule T, cellule di Merkel nonché terminazioni nervose e dotti ghiandolari.

Lo strato intermedio è il derma costituito da una matrice extracellulare (ECM) contenente principalmente collagene prodotto da cellule chiamate fibroblasti (FB). La regione superiore del derma (derma papillare) contiene un alto rapporto di collagene di tipo III e fibroblasti a densità più elevata mentre la regione inferiore (derma reticolare) contiene un alto rapporto di collagene di tipo I e una densità inferiore di fibroblasti. La disposizione dell'ECM nel derma contribuisce alla natura anisotropica della pelle (risposta meccanica differente in base alla direzione di provenienza dello stimolo), contribuendo a garantire la resistenza meccanica e l'elasticità del tessuto oltre che ottima resistenza alla deformazione. Il derma contiene vasi sanguigni, neuroni sensoriali, nodi del sistema immunitario e varie appendici cutanee, come il follicolo pilifero e corpuscoli tattili. Funziona come isolante, meccanico e termico, come difesa immunitaria e mantiene una corretta idratazione.

Lo strato più interno, l'ipoderma, è costituito da lipociti e collagene che costituiscono un deposito adiposo sottocutaneo ed inoltre contiene varie appendici come follicoli piliferi, ghiandole sudoripare, ghiandole sebacee, nervi, dotti linfatici e vasi sanguigni. Infine funge da isolante [3].

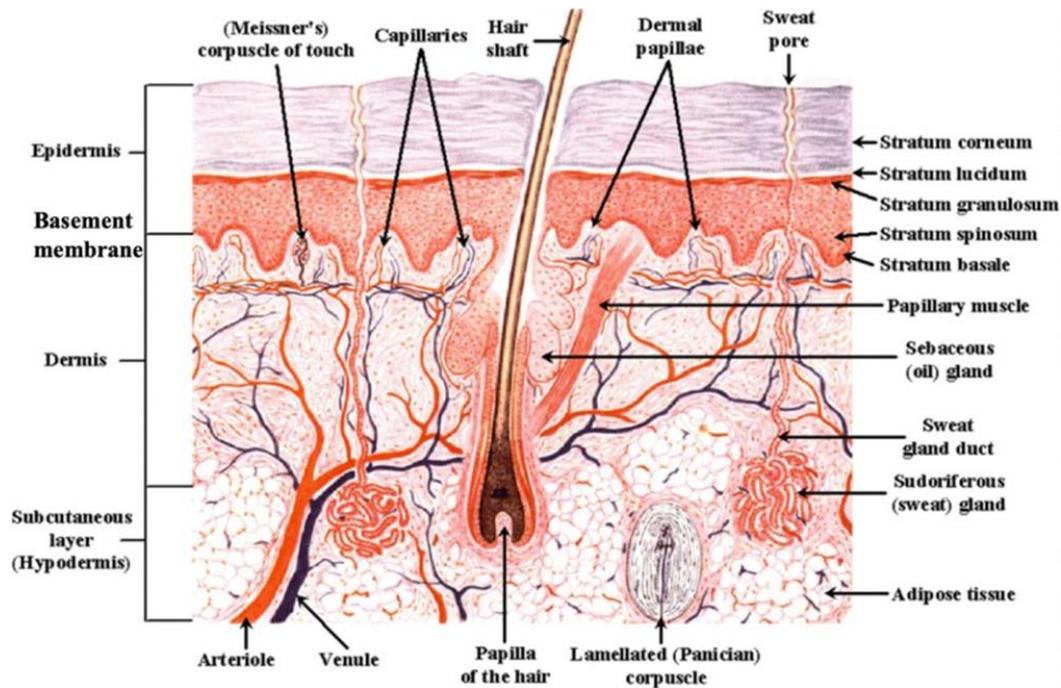


Fig.1: rappresentazione della struttura anatomica della pelle umana

La pelle, troppo spesso vista come semplice rivestimento carnale in realtà riveste un numero estremamente elevato di funzioni vitali tra cui quello di barriera protettiva dall'ambiente esterno e dall'ingresso di xenobiotici, tossine e agenti patogeni, barriera per l'assorbimento della luce UV, protezione immunitaria, barriera meccanica, funzione di percezione tattile, di temperatura e di dolore e funzione regolatoria essendo implicata nel mantenimento di una adeguata temperatura corporea (isolamento termico) e nel controllo dell'idratazione del corpo (un esempio è quello della sudorazione). Regola il trasporto di acqua e piccoli metaboliti fuori dal corpo e protegge i muscoli, le ossa, i legamenti e gli organi interni sottostanti. La pelle fornisce resistenza alle forze applicate, tuttavia, è anche un materiale dinamico che può rimodellare la sua struttura per rispondere ai cambiamenti nell'ambiente interno ed esterno [4].

E' uno dei principali organi preposti al mantenimento dell'omeostasi corporea.

L'importanza di queste funzioni diventa evidente dai disturbi fisiologici che si verificano nei pazienti con grandi ulcere croniche, ferite gravi o ustioni. Lesioni o malattie che causano la perdita di integrità della pelle comporteranno uno squilibrio fisiologico sostanziale e talvolta una disabilità significativa, fino anche alla morte. Qualsiasi tentativo di sostituire i difetti di questo tessuto biologico, nel suo spessore totale o parziale deve ricreare accuratamente l'architettura per riprodurre queste funzioni. La pelle serve come prima linea di difesa da qualsiasi stimolo esterno pertanto è l'organo più vulnerabile alle lesioni e necessita di metodi di rigenerazione rapidi e affidabili in caso di ferita o danneggiamento [4].

L'epidermide è uno strato altamente rigenerativo della pelle grazie alla presenza di cellule staminali che contribuiscono alla riparazione della ferita. La guarigione delle ferite e quindi la rigenerazione del tessuto cutaneo sono un processo molto ben coordinato e dipendono da diversi fattori, come il tipo di ferita (epidermica, profonda cutanea, a tutto spessore), il danno tissutale causato dall'ustione (primo, secondo e terzo grado) o trauma fisico, condizioni di umidità intorno alla ferita, infiammazione, infezioni secondarie, ecc. La maggior parte delle ferite minori viene guarita dalla semplice contrazione e crescita delle cellule all'interno della ferita. Tuttavia, le grandi ferite della pelle impiegano molto più tempo a guarire e quindi sono più inclini a rischi, come infiammazione, infezione, formazione di cicatrici, ecc. che si traduce nella formazione di ferite croniche.

Nei casi in cui una notevole quantità di pelle sia andata perduta a causa di lesioni, diventa fondamentale sostituire la cute compromessa tramite innesti per proteggere dalla perdita di acqua dal corpo e per mitigare il rischio rappresentato da agenti patogeni opportunistici. Gli innesti cutanei possono anche facilitare notevolmente il processo di guarigione delle ferite e possono potenzialmente ripristinare le funzioni di barriera e di regolazione nel sito della ferita [5].

La sostituzione della pelle è stata un obiettivo a lungo ricercato per la medicina moderna, dal primo lavoro pionieristico di Jacques-Louis Reverdin nel 1870 usando alloinnesti di "pelle fresca", ai materiali biologici attualmente in uso nelle moderne sale operatorie [6]. Negli ultimi decenni sono stati compiuti progressi significativi nel campo dell'ingegneria rigenerativa del tessuto cutaneo, sia nello sviluppo di sostituti ingegnerizzati utili alla sostituzione di pelle persa a causa di traumi, ferite o ustioni, sia come modello realistico da utilizzare per eseguire test di prodotti in campo farmaceutico e cosmetico [3].

In particolare le ustioni sono una causa significativa di trauma e, nel corso degli anni, l'attenzione della cura del paziente si è spostata dalla semplice sopravvivenza alla chiusura accelerata della ferita, al miglioramento della qualità della cicatrice ed a risultati funzionali migliori. Questo ambito è particolarmente importante dal momento che le ustioni sono uno dei traumi più frequenti in tutto il pianeta. Infatti ogni anno oltre 11 milioni di persone necessitano di cure mediche legate alle ustioni, sia derivanti da incidenti domestici, sia da incidenti sul lavoro e da conflitti armati. Incendi, fiamme, elettricità, scottature e prodotti chimici sono state le principali cause di tali ustioni. Solitamente il trattamento delle

ustioni (soprattutto in caso di lesioni estese), comporta l'asportazione chirurgica della pelle danneggiata e la ricostruzione della lesione con l'aiuto di sostituti della pelle [4]. Per le ustioni profonde di terzo grado, l'opzione migliore dell'ingegneria del tessuto cutaneo è l'uso di autotrapianti sebbene sia limitato dalla quantità e dalla dimensione degli innesti disponibili oltre ad altri fattori come la creazione di una ferita secondaria e altri rischi. Altri tipi di innesti cutanei come allotrapianti e xenotrapianti sono associati ai rischi di reazioni immunitarie e trasmissione di malattie oltre ad alcune questioni etiche e culturali. Anche se recentemente sono stati fatti progressi nel trattamento di queste ferite, l'innesto cutaneo a spessore diviso autologo (ASSG) rimane il gold standard nella clinica per le ferite di grandi dimensioni. ASSG prevede la rimozione di un pezzo di pelle da un sito chirurgico secondario del paziente, l'allungamento della pelle e la applicazione dell'innesto sulla pelle compromessa. Tuttavia, ASSG è limitato dal numero e dalla dimensione dei siti dei donatori [3]. La disponibilità di costrutti cutanei fabbricati mediante bioprinting usando cellule in vitro espanse dalla biopsia cutanea allevia il problema della carenza di siti di donatori in ASSG.

L'elemento più importante per la rigenerazione cutanea è la selezione e sviluppo di matrici idonee per scaffold, che possono essere di diversa tipologia come ad esempio porosi, fibrosi, microsfele, idrogel, compositi e acellulari, ecc. ed ognuna presenta diversi vantaggi e svantaggi [1].

Tali scaffold possono essere costituiti da biomateriali naturali altamente biocompatibili, come collagene, chitosano, alginato ecc. oppure biomateriali sintetici, come il policaprolattone (PCL) e polietilenglicole (PEG), ecc. o ancora biomateriali compositi, che sono una combinazione di biomateriali naturali e sintetici, altamente biocompatibili con una maggiore efficacia nella rigenerazione cutanea in quanto le due tipologie di biomateriali collaborano colmando l'una i punti di debolezza dell'altra presentando pertanto delle caratteristiche finali con molti più vantaggi e molti meno svantaggi per il raggiungimento dello scopo finale desiderato. Questi scaffold (in particolare quelli porosi) sintetici o naturali o compositi, consentono un'alimentazione adeguata tramite perfusione delle cellule e promuovono la proliferazione e la differenziazione cellulare per produrre un tessuto che imita le caratteristiche strutturali e biologiche della pelle nativa. Una conoscenza adeguata delle proprietà, dei vantaggi e degli svantaggi di vari biomateriali e tipologie di scaffold accelererà la produzione di questi ultimi adatti per le applicazioni di rigenerazione del tessuto cutaneo. Allo stesso tempo, l'attenzione su alcune delle principali

sfide nel campo dell'ingegneria dei tessuti della pelle, come l'interazione cellulare con tali scaffold, la proliferazione/differenziazione cellulare più rapida e la vascolarizzazione dei tessuti ingegnerizzati è inevitabile, così come lo saranno gli approfondimenti in vari campi come l'ingegneria dei polimeri, la bioingegneria, la ricerca sulle cellule staminali e la nanomedicina.

L'approccio tradizionale utilizzato per l'ingegneria della pelle umana è quello di semplificare la struttura della pelle altamente complessa in due componenti: epidermide e derma, contenenti solo due tipi di cellule, rispettivamente i cheratinociti (CK) e i fibroblasti (FB). Il derma viene creato combinando scaffold polimerici sintetici (e. policaprolattone (PCL) e polietilenglicole (PEG)) e scaffold proteici (es. collagene e fibrina) con fibroblasti. Gli idrogel di collagene, in particolare, tentano di imitare la costruzione della matrice nativa e cercano di raggiungere uno "stato pronto" di fibroblasti mantenuti in una matrice extracellulare dermica. Successivamente, i cheratinociti vengono aggiunti in cima e lasciati coprire la superficie superiore del costrutto. I costrutti maturano quindi all' "interfaccia aria-liquido", permettendo ai cheratinociti di stratificare e completare l'epidermide cheratinizzata. Con questo approccio, è possibile ottenere un tessuto con una certa somiglianza biologica e morfologica con la pelle umana; e benché siano stati raggiunti notevoli traguardi nella cura di ferite superficiali, la piena funzionalità della pelle come le interazioni cellula-cellula critiche, le comunicazioni di segnale e le funzioni di barriera non vengono realizzate a pieno usando questo modello di base [7]. Infatti, la cura di lesioni più profonde (come quelle dovute ad ustioni di terzo e quarto grado) risulta quasi impossibile con questo metodo. Inoltre gli equivalenti tissutali così creati sono ancora privi di molte caratteristiche quali: innervazione, vascolarizzazione, follicoli piliferi [8] e non contengono tutti i tipi di cellule cutanee limitando così la rigenerazione della fisiologia cutanea nativa.

- Introduzione alla 3D bioprinting

Gli approcci convenzionali (ad es. pipettaggio) hanno una capacità limitata di disporre cellule e matrice extracellulare specifica per la creazione del tessuto ingegnerizzato [9]. Pertanto, di recente, ha assunto una importanza sempre maggiore la tecnologia di stampa 3D definita 3D bioprinting. Essa facilita la deposizione simultanea e altamente specifica di molteplici tipi di cellule della pelle e biomateriali, con una precisione assente nei tradizionali approcci di ingegneria dei tessuti. Di conseguenza quelli che si creano sono costrutti formati da scaffold caricati con cellule che si adattano in maniera assai migliore al tessuto originale rispetto a quelli generati con un approccio convenzionale. Questa tecnologia sta emergendo come una nuova strategia per superare gli attuali limiti nell'ingegneria dei tessuti cutanei come la scarsa o assente vascolarizzazione, l'assenza di follicoli piliferi e ghiandole sudoripare nel costrutto [10].

Molti sforzi in 3D bioprinting si sono concentrati finora sull'incorporazione di solo due tipi di cellule, ovvero KC e FB, rispettivamente nell'epidermide e nel derma, nonostante la pelle sia un deposito di quasi una dozzina di cellule dal lignaggio differenziato e cellule staminali multipotenti. Sebbene ciò sia sufficiente per riprodurre le strutture dominanti all'interno della pelle, non si riesce in questo modo a riprodurre le interazioni cellula-cellula critiche, segnali di eventi e, cosa molto importante, funzioni immunitarie della pelle. Attualmente, un fattore limitante chiave nell'incorporare le cellule immunitarie nella pelle è la sfida di mantenere le cellule nel loro stato immunitario ingenuo, ed è probabilmente correlato alla loro inefficiente incorporazione all'interno degli strati specifici della pelle oltre all'assenza di altre cellule funzionalmente importanti [3] [8] [9].

Il processo di bioprinting cutaneo, come si vedrà in seguito, prevede la raccolta di tessuti cutanei dai pazienti mediante biopsia cutanea e la loro coltivazione in vitro per ottenere un numero sufficiente di cellule. A questo punto le cellule epiteliali coltivate vengono miscelate con biomateriali e consegnate a una bioprinter tridimensionale (3D) per la fabbricazione di pelli personalizzate [3] [7].

La 3D bioprinting offre un numero elevatissimo di vantaggi rispetto alla tradizionale costruzione di pelli ingegnerizzate in vitro "a mano". Infatti tali approcci di ingegneria dei tessuti convenzionali soffrono di problemi intrinseci di distribuzione non omogenea delle

cellule, incapacità di integrazione e vascolarizzazione al momento dell'impianto, con conseguente rifiuto del biomateriale impiantato insieme alla cute formata [9].

In linea di principio il bioprinting funziona in modo simile alla convenzionale tecnologia di stampa 3D in cui l'inchiostro di stampa denominato "bioink" contiene biomateriali e cellule per la produzione di tessuti. La tecnologia di bioprinting mira a generare costrutti organizzati ed accuratamente controllati tali da assomigliare il più possibile alle complesse architetture dei tessuti nativi originali.

Utilizzando la tecnologia di bioprinting è possibile creare una varietà di strutture interne e pori che vanno da decine a centinaia di micrometri in idrogel. Di conseguenza, è possibile generare diversi strati di pelle come strato corneo, epidermide, derma papillare, derma reticolare e strutture come reti vascolari, ghiandole sudoripare e follicoli piliferi. Le strategie di ingegneria tissutale combinate con la tecnologia di bioprinting possono ridurre notevolmente i problemi come fallimento dell'innesto, scarsa guarigione, limitata vascolarizzazione, trasferimento di agenti patogeni e rigetto immunitario [5] [7].

Questa tecnica facilita la fabbricazione rapida e ripetibile (entrambe caratteristiche cruciali) di costrutti di tessuto poliedrico. Il punto cruciale di questa tecnologia risiede nella possibilità di controllare con estrema precisione la deposizione del bioink in tre dimensioni, permettendo la creazione di costrutti assai complessi, dando anche l'opportunità di creare regioni ben distinte in quanto a composizione matriciale, fattori bioattivi e composizione cellulare al fine di ricostruire in maniera sempre più precisa ed accurata la struttura del tessuto nativo.

Altro punto cruciale grazie al quale si evidenziano i vantaggi di tale tecnica è la necessità di generare costrutti di dimensioni, spessore, superficie di estensione sempre differenti da paziente a paziente per riparare il difetto generatosi nel tessuto.

Capace di dispensare cellule vive, fattori solubili e idrogel a cambiamento di fase secondo uno schema desiderato, pur mantenendo un'elevata vitalità cellulare, questo approccio ha un enorme potenziale nella fabbricazione del tessuto cutaneo 3D. Individuando con precisione più tipi di materiali e cellule della matrice in un assemblaggio strato per strato, è possibile fabbricare vari tessuti funzionali con strutture e composizioni cellulari appropriate in una vasta gamma di dimensioni, con un alto rendimento e in modo altamente riproducibile.

La struttura multi-strato e altamente stratificata della pelle lo rende un esempio perfetto per dimostrare i punti di forza e i vantaggi dell'approccio di bioprinting 3D, superando alcuni dei limiti dei tradizionali schemi di ingegneria dei tessuti [6].

Come detto, la pelle è un organo complesso con una struttura ben definita costituita da più strati e appendici ed è composta da diversi tipi di cellule. Pertanto, per bioprintare una tale struttura sono necessari più tipi di cellule e di biomateriali. A seconda delle caratteristiche dei vari compartimenti del tessuto cutaneo, e per riprodurre più fedelmente possibile le peculiarità, si può ricorrere a tecniche di stampa 3D differenti per ognuno di essi.

L'uso della bioprinting consentirà l'incorporazione di altri tipi di cellule nel derma, compresi i follicoli piliferi e le ghiandole sebacee e sudoripare [11]. Ciò consentirà la rigenerazione del tessuto cutaneo con struttura e composizione cellulare simili al tessuto nativo. Inoltre, la bioprinting consentirà il controllo della microarchitettura dei componenti del tessuto cutaneo, che può avere un ruolo nella formazione della cicatrice durante il processo di riparazione e guarigione della ferita in seguito a una lesione.

La bioprinting può essere eseguita in situ o in vitro. Entrambi questi approcci sono simili, ad eccezione del sito di stampa e della maturazione dei tessuti. Ci sono sfide tecnologiche e normative che devono essere superate per l'applicazione clinica della pelle così creata per la ricostruzione delle lesioni da traumi o ferite. Nel complesso, la bioprinting 3D è una tecnologia molto trasformativa e il suo uso per la ricostruzione della ferita porterà a un cambiamento nei risultati fino ad ora osservati sui pazienti [13].

La stampa della pelle affronta numerose sfide ampiamente associate alla bioprinting 3D generale: in primis la selezione di tipi di cellule e biomateriali da utilizzare per la formulazione del miglior bioink possibile (ovvero l'inchiostro che verrà utilizzato dalla stampante), in seguito sarà di fondamentale importanza la scelta della migliore tecnologia di stampa tra quelle attualmente a disposizione per la produzione di tessuti biologici. Saranno necessari, per la crescita, proliferazione e differenziamento del tessuto stampato formati di coltura in vitro in un'interfaccia aria-liquido oppure agenti chimici, naturali o sintetici per la reticolazione e dunque per la stabilizzazione del costruito generato.

Un altro vantaggio della 3D bioprinting è il tempo notevolmente inferiore impiegato per la produzione dei costrutti di pelle ingegnerizzata, ottenendo una produzione rapida e affidabile di sostituti della pelle biomimetici [3].

Sono le cellule staminali ad essere le maggiormente studiate negli ultimi anni ed in particolare le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC), per via della loro capacità di differenziarsi in una vastissima gamma di linee cellulari differenti ed essendo eticamente preferibili rispetto a vari tipi di cellule staminali originarie [12].

Il tessuto cutaneo stampato con 3D bioprinting ha il potenziale per favorire lo sviluppo della formulazione e lo screening dei farmaci, esaminando la permeabilità e le risposte infiammatorie degli agenti farmaceutici (per fare ciò è necessario un costrutto di pelle estremamente funzionale), il trapianto clinico, i test chimici e cosmetici, nonché la ricerca di base, visti anche i recenti divieti posti all'utilizzo di pelli animali per testare determinati tipi di farmaci e la troppa differenza di risposta di tali pelli animali a gran parte dei cosmetici rispetto alla pelle umana, cosa che per altro vale anche per vari tipi di farmaci, e talvolta i risultati ottenuti dai test non sono sempre predittivi per l'uomo. I modelli di pelle hanno un valore aggiuntivo come strumenti per comprendere le malattie della pelle e la biologia della pelle fondamentale. Grazie alla 3D bioprinting, infatti, tramite una corretta scelta di biomateriali e cellule è possibile creare costrutti di pelle umana malata (ad esempio affetta da tumore o cancro) per comprendere appieno lo sviluppo della malattia e la reazione agli agenti farmaceutici. Rigenerando i microambienti del cancro della pelle attraverso la bioprinting 3D potrebbe essere possibile studiare la proliferazione cellulare, le metastasi e i test chemioterapici dei farmaci, imitando più fedelmente le risposte in vivo rispetto alla coltura cellulare [3].

I due componenti più importanti che decidono il destino della costruzione ingegnerizzata dei tessuti sono le cellule e le matrici extracellulari artificiali (ECM), che supportano la crescita, la differenziazione e la migrazione cellulare.

In questo lavoro si discuteranno e riassumeranno le informazioni disponibili sulla bioprinting della pelle come i metodi di bioprinting, le strategie di solidificazione e consolidamento del costrutto finale, il caricamento delle cellule e dei biomateriali per creare il bioink utilizzato durante la bioprinting. Si mostreranno i risultati, le sfide e le prospettive future del bioprinting cutaneo. Verranno discussi i biomateriali utilizzati e le loro proprietà relative all'ingegneria

dei tessuti della pelle, i polimeri naturali e sintetici più comunemente sfruttati, le loro miscele e composti come bioink.

Il processo di bioprinting 3D del tessuto cutaneo umano può essere suddiviso in quattro fasi [3]:

- 1) Pre-elaborazione, comprendente l'imaging, la selezione delle cellule, la selezione dei biomateriali e la progettazione del modello del tessuto cutaneo;
- 2) Elaborazione o processo di stampa effettivo;
- 3) Post elaborazione, tra cui proliferazione cellulare, rimodellamento dei tessuti e maturazione dopo la stampa di costrutti della pelle;
- 4) Verifica di funzionalità, compresa la caratterizzazione biochimica e fisiologica del tessuto cutaneo stampato.

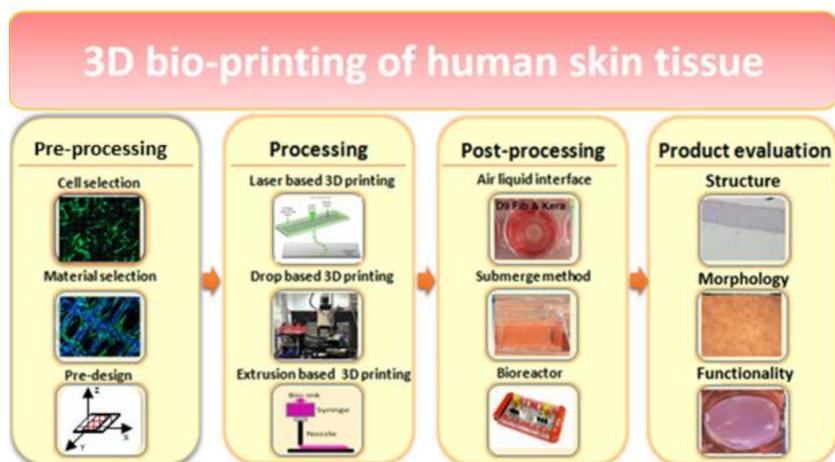


Fig.2: successione delle fasi fondamentali per la stampa di pelle in 3D

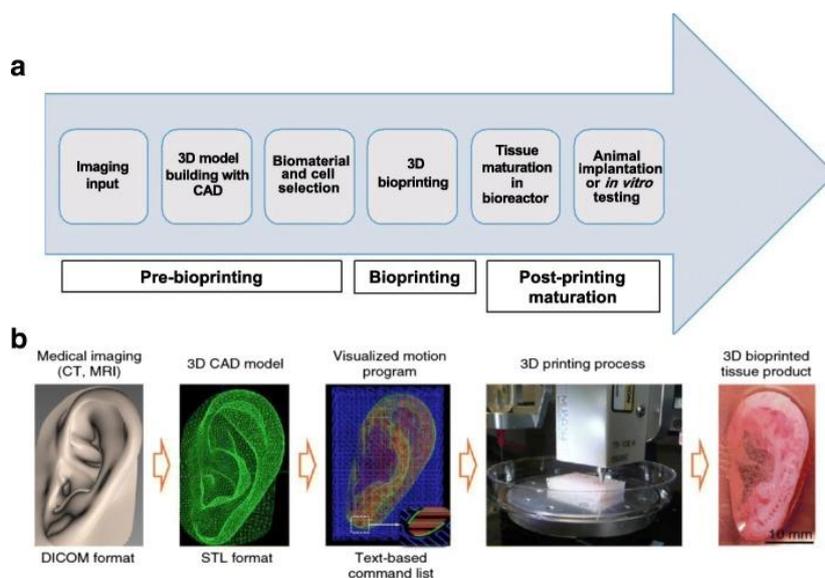


Fig.3: (a) successione degli step fondamentali per la stampa di pelle in 3D e (b) rappresentazione di tali step applicati alla stampa 3D di un orecchio umano adulto di 8 cm di altezza.

Il presente elaborato si struttura seguendo l'ordine appena mostrato, ovvero quello effettivo del processo di stampa 3D e delle sue fasi. Pertanto verranno in primo luogo presentati tecniche di imaging, cellule e biomateriali utilizzati nel processo, per poi passare ad una analisi delle tecniche di bioprinting cutaneo con relativi risultati raggiunti nel corso degli anni, arrivando in seguito a considerazioni sulla valutazione dei prodotti ottenuti e delle loro proprietà istologiche e biomeccaniche giungendo, infine, a mostrare innovazioni rilevanti nel campo della 3D bioprinting cutanea e sfide future nell'ambito.

L'obiettivo di questo lavoro è quello di analizzare lo stato dell'arte per quanto riguarda la rigenerazione della pelle nei vari aspetti quali, in primis, la 3D bioprinting (e relativi bioinchiostri) come tecnica innovativa e attualmente di maggiore prospettiva utilizzata a tale scopo e poi differenti biomateriali e principali tipi di cellule utilizzate con le relative proprietà, vantaggi e svantaggi di ognuno, oltre che una analisi dei vari approcci nella progettazione e creazione di scaffold (approcci scaffold-guided) o nella loro totale assenza (approcci scaffold-free). Verranno inoltre presentati i risultati di maggior rilievo presenti in letteratura.

2 MATERIALI E METODI

2.1 TECNICHE DI IMAGING

Per stampare una rappresentazione anatomicamente corretta della pelle umana, è necessario ottenere una rappresentazione precisa delle proprietà geometriche della pelle. Ciò è particolarmente importante quando si creano modelli di pelle paziente-specifici e modelli di pelle patologica per test farmaceutici. Varie tecniche di imaging non invasive come la tomografia computerizzata (CT), la risonanza magnetica (MRI), l'ecografia (US) e la tomografia a coerenza ottica (OCT) vengono utilizzate per catturare le immagini che rappresentano l'anatomia della pelle [3] [10]. La TC viene solitamente utilizzata come tecnica di imaging per acquisire informazioni sui componenti dei tessuti duri. Con le scansioni CT, le forme facciali 3D possono essere rappresentate aiutando nella generazione di innesti cutanei personalizzati, mentre l'utilizzo dei raggi X presenta un rischio per la salute dell'uomo. Rispetto alla TC e alla risonanza magnetica, la tecnica di imaging ad ultrasuoni sta diventando sempre più popolare per l'imaging cutaneo [13]. Con la scansione a ultrasuoni, i tre strati di pelle umana possono essere distinti nell'immagine. Invece delle onde ultrasoniche, l'OCT utilizza la luce infrarossa e i metodi interferometrici per rilevare la luce riflessa, mostrando una risoluzione più elevata rispetto alla tecnica di imaging ad ultrasuoni. L'epidermide e il derma possono essere distinti in base alle informazioni sulle appendici cutanee (follicoli piliferi e ghiandole eccrine) identificate nella pelle [15]. Oltre a ottenere le immagini per la ricostruzione di modelli 3D della pelle in termini di strutture anatomiche è fondamentale anche il riconoscimento del colore durante le fasi di pre-processing, in particolare per la stampa di tessuti cutanei come innesti di pelle o modelli di malattia per lo sviluppo di farmaci. Sono 14 le tonalità di pelle riproducibili utilizzando la tecnica di 3D bioprinting. Gli approcci di modellazione possono essere classificati in progettazione assistita da computer (CAD), progettazione basata su immagini, progettazione a forma libera, superfici implicite e curve di riempimento dello spazio. Per la stampa di tessuti cutanei, le limitazioni associate ai sistemi basati su CAD, come il controllo limitato delle proprietà biomeccaniche impartite alla costruzione dei tessuti, possono ostacolare l'applicazione nella stampa cutanea [10].

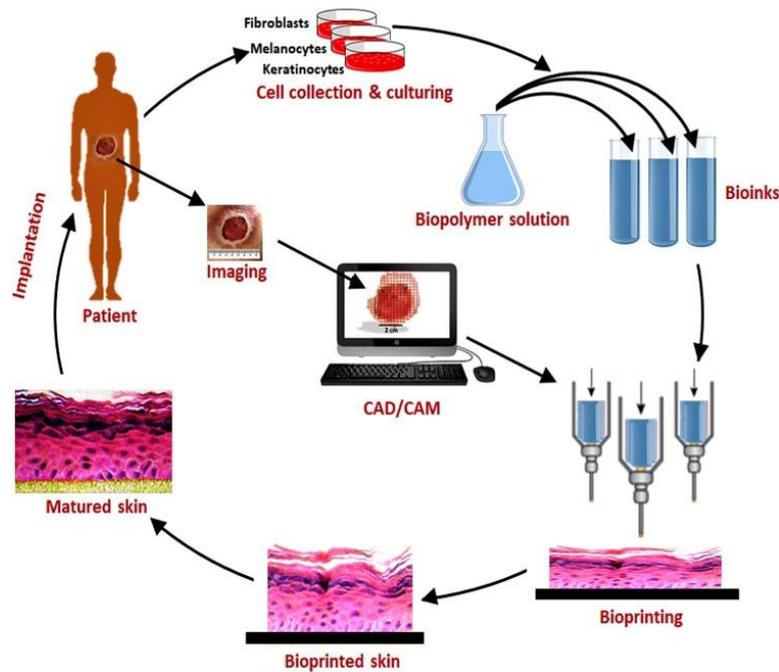


Fig.4: rappresentazione del ruolo centrale dell'imaging all'interno del processo di stampa 3D cutanea, per la creazione di progetti CAD/CAM necessari per guidare la stampante durante il processo di stampa

Per progettare il percorso di stampa che guida i movimenti delle testine della stampante vengono attualmente utilizzati due approcci: la forma cartesiana e la forma parametrica. Il percorso di stampa progettato in forma cartesiana può essere utilizzato nella maggior parte delle bioprinter tra cui bioprinter laser, bioprinter a getto d'inchiostro e bioprinter ad estrusione. La direzione di deposizione è guidata con una variazione di 0/90 gradi su ogni strato. Sebbene la progettazione del percorso di stampa in forma cartesiana sia in grado di depositare continuamente biomateriali con una minima congestione del fluido, ci sarà un bioink accumulato nei punti in cui la direzione cambia a zig-zag. Pertanto, l'uniformità dello strato depositato viene influenzata in questa regione. Per la stampa della pelle, la progettazione del percorso in forma cartesiana può essere utilizzata per stampare una struttura semplificata in cui non vengono considerate strutture complesse come vasi sanguigni e follicoli piliferi.

Le coordinate parametriche vengono utilizzate per consentire la pianificazione del percorso utensile per domini geometrici complessi. È possibile ottenere una deposizione continua attraverso una struttura porosa e una transizione graduale tra i materiali con la progettazione del percorso in forma parametrica. Pertanto, questo metodo di progettazione del percorso è consigliato quando si desidera una struttura completa della pelle [3].

La maggior parte della bioprinting 3D si basa sulle proprietà biomateriali. Il bioink utilizzato nella stampa cutanea è poco rigido e pertanto potrebbe non essere in grado di supportare il design in precedenza progettato a causa delle difficoltà di stampa nel mantenere la forma originale. Ad esempio, il materiale tipicamente usato per la stampa della pelle, il collagene di tipo I, si gonfia, disidrata, si restringe e si diffonde dopo la stampa. Pertanto, durante il processo di pre-progettazione, gli approcci di modellizzazione dovrebbero prendere in considerazione le proprietà del bioink e dovrebbero essere sviluppati software con flessibilità nella progettazione di percorsi personalizzati [3].

2.2 LE CELLULE

Analizziamo le proprietà delle cellule principali scelte per la rigenerazione del tessuto cutaneo.

- I cheratinociti

L'epidermide è un tessuto altamente proliferativo, che può facilmente rigenerarsi a seguito di molti traumi minori e meno importanti. Il principale tipo di cellula nell'epidermide sono i cheratinociti (KC), che formano lo strato epidermico esterno. Ci sono molti vantaggi nell'uso dei cheratinociti nell'ingegneria dei tessuti della pelle: possono essere coltivati, mantenuti in vita e possono proliferare in laboratorio con facilità e la loro resistenza alla senescenza è così grande che possono essere fatti passare per molte centinaia di generazioni [3]. Tuttavia ci sono limiti schiacciati che impediscono il solo uso di cheratinociti per progettare un sostituto cutaneo completamente funzionale. Il primo grande svantaggio è il tempo necessario per coltivare queste cellule. Sono necessarie circa 3 settimane per l'espansione di una biopsia su una superficie di 2 cm² che può richiedere anche più tempo per i pazienti anziani [10]. La presenza e il grado di cicatrici sono direttamente proporzionali al tempo di guarigione, che è ovviamente più lungo quando si usano i cheratinociti. Il problema intrinseco della fragilità a lungo termine dei cheratinociti può essere superato avendo uno strato di fibroblasti dermici al di sotto di esso. Durante la differenziazione terminale dello strato epidermico, le cellule cheratinocitiche esprimono diverse proteine di differenziazione tra cui le cheratine. Le cheratine svolgono un ruolo essenziale nella sintesi proteica, proteggendo le cellule epiteliali dallo stress e fornendo supporti strutturali per la crescita e la differenziazione delle cellule. I cheratinociti geneticamente modificati, che sovraesprimono il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), sono stati segnalati per promuovere la vascolarizzazione [16].

- I fibroblasti

I fibroblasti sono un importante tipo di cellula del derma e sono responsabili della produzione di matrice extracellulare (fibre di collagene, matrice extrafibrillare e fibre elastiche) e componenti non fibrosi come glicosaminoglicani e proteoglicani. Uno dei fattori più importanti che determinano il successo dell'ingegneria dei tessuti è la scelta delle cellule

idonee, garantendo la persistenza e la funzionalità del tessuto rigenerato per la vita del paziente. Il fatto che i fibroblasti provenienti da diversi siti del corpo possiedano proprietà funzionali diverse, dovrebbe essere considerato prima della selezione poiché ciò potrebbe influire sulla loro idoneità per i sostituti cutanei. Mentre lo strato papillare superiore contiene fibre di collagene vagamente intrecciate per lo più composte da collagene di tipo I e III, fibre di collagene di tipo VII ed elastina, il derma reticolare inferiore è composto da fibre di collagene di tipo I densamente impacchettate (~ 100µm di diametro) allineati parallelamente alla superficie della pelle [3] [10].

- I melanociti

I melanociti sono le cellule che producono il pigmento. Provengono dalla cresta neurale e risiedono nello strato basale. Queste cellule producono e trasferiscono melanina all'interno di organelli chiusi chiamati melanosomi. La pigmentazione irregolare è una limitazione, che può essere superata co-coltivando melanociti insieme a cheratinociti, che garantiscono la normale pigmentazione secernendo melanina. Ci sono voluti oltre 30 anni per costruire un modello di pelle ingegnerizzata che incorporasse melanociti funzionali. La co-coltura di cheratinociti con melanociti in un modello a tutto spessore è essenziale per regolare l'adesione, la vitalità e la morfologia dei melanociti mediante fattori endocrini.

Per studiare gli effetti delle cellule vicine sulla regolazione dell'attività e della pigmentazione dei melanociti sono state condotte analisi sui modelli di espressione genica nei fibroblasti derivati da pelli di diversi colori. I risultati hanno dimostrato che le differenze in un certo numero di geni, che sono secreti dai fibroblasti nelle pelli scure, potrebbero migliorare efficacemente la pigmentazione dei melanociti nei modelli di pelle artificiale. Inoltre, i melanociti primari in co-coltura con cellule staminali adipose hanno presentato una migliore efficacia della pigmentazione, compresa la durata vitale rispetto a quella della coltura pura di melanociti. Uno studio ha anche rivelato che la presenza di proteine della membrana basale (BM) è necessaria per l'orientamento posizionale dei melanociti [2] [10] [3].

- Cellule di Langerhans

I cheratinociti, i melanociti, le cellule di Merkel e le cellule di Langerhans (LC) (cellule dendritiche epiteliali) nell'epidermide sono i responsabili preliminari della regolazione delle funzioni proinfiammatorie e immunitarie. A causa del ruolo fondamentale delle LC epidermiche nell'espressione degli antigeni nelle risposte immunologiche, l'integrazione dei

LC nei costrutti in vitro ha suscitato molta attenzione. Simile ai melanociti, lo sviluppo, il reclutamento e la conservazione degli LC in uno strato epidermico artificiale sono regolati dalle interazioni con i cheratinociti. La coltura delle cellule umane primarie di Langerhans è difficile. In generale, ci sono due possibilità per studiare LC primarie al di fuori del corpo umano, tra cui: 1) espianti cutanei e 2) innesti cutanei su topi "nudi" [10].

- Le cellule endoteliali

La vascolarizzazione è un altro problema, che può essere gestito in una certa misura incorporando le cellule endoteliali per facilitare l'angiogenesi. I vasi sanguigni ricostruiti all'interno di un equivalente cutaneo possono migliorare la longevità del modello fornendo nutrienti per le cellule in coltura. In pratica, come vedremo, gli scienziati hanno incorporato canali vascolari nello strato cutaneo attraverso la co-coltura di cellule fibroblastiche con cellule endoteliali delle vene ombelicali umane (HUVEC), che hanno indotto la formazione spontanea di capillari nel sangue all'interno del costrutto. Studi separati hanno anche rivelato che le cellule staminali derivate dall'adipe umano in co-coltura con HUVEC/cheratinociti o cellule progenitrici endoteliali (EPC) potrebbero migliorare il processo di vascolarizzazione [17].

- Le cellule staminali

La maggior parte delle attuali strategie di ingegneria dei tessuti dipende da un campione di cellule autologhe del tessuto o organo ospite danneggiato. Diventa sempre più difficile ottenere le cellule dall'ospite danneggiato quando la lesione o il danno sono estesi. Fonti cellulari alternative diventano una necessità in questi casi. Affinché i tessuti e gli organi mantengano un equilibrio tra perdita e sostituzione cellulare, i tessuti devono possedere cellule in grado di autorinnovarsi e differenziarsi e, quindi, le cellule staminali sono considerate una fonte promettente per la futura rigenerazione della pelle e il tessuto cutaneo ingegnerizzato. Sono stati identificati e localizzati molti tipi di cellule staminali che popolano la pelle, tra cui cellule staminali epidermiche (cellule staminali interfollicolari e cellule staminali di rigonfiamento), cellule staminali cutanee, cellule staminali sebacee, cellule staminali melanocitarie, cellule staminali del follicolo pilifero, cellule staminali delle ghiandole sudoripare, cellule staminali endoteliali, cellule staminali mesenchimali (MSC), cellule staminali ematopoietiche (HSC) e cellule staminali neurali [3]. Sebbene le cellule staminali cutanee residenti nel luogo della ferita siano la fonte preferita di cellule per i modelli di pelle 3D e la rigenerazione della pelle, le cellule staminali mesenchimali (MSC) derivate da altri

tessuti sono state utilizzate anche per migliorare la funzionalità dei modelli. Le ragioni principali delle estese applicazioni delle MSC nella ricostruzione cutanea è: 1) autorinnovamento e capacità di differenziazione multidirezionale e 2) raccolta facile e immunogenicità debole. Negli ultimi anni, le cellule staminali mesenchimali derivate dal midollo osseo (BM-MSC), una popolazione di cellule staminali multipotenti, hanno mostrato risultati promettenti nella guarigione e rigenerazione delle ferite della pelle. Potrebbero essere incorporate nei modelli di pelle artificiale in bassa percentuale (10%) e mostrare la formazione di un'epidermide stratificata simile alla struttura della pelle intatta [18]. Oltre alle applicazioni delle MSC per lo sviluppo di un equivalente cutaneo in vitro, le cellule staminali pluripotenti (PSC) come le cellule staminali pluripotenti di origine germinale che possono rigenerare patologie congenite della pelle e creare un'epidermide stratificata stanno guadagnando interesse. Tuttavia, l'eterogeneità dei PSC, i loro diversi stadi di differenziazione, la mutagenesi durante la riprogrammazione cellulare, l'amplificazione delle cellule PSC e le costose procedure per la preparazione delle cellule sono le preoccupazioni principali che richiedono un'ulteriore ottimizzazione [12].

Poiché più tipi di cellule incorporate nello stesso o polimeri diversi devono essere stampati in parallelo, è necessario preparare molti bioink per ogni stampa. Poiché le cellule staminali sono totipotenti, la stampa con cellule staminali ridurrà il numero di bioink necessari per un determinato bioprinting. Al fine di evitare la risposta immunitaria, in contesti clinici, le cellule verrebbero isolate dai pazienti che necessitano di un impianto tramite biopsia. In tali situazioni, le cellule staminali isolate dal paziente stesso con il potenziale intrinseco di proliferare e differenziarsi in qualsiasi tipo di cellula desiderata sono la fonte di cellule più adatta e promettente [11].

Le cellule staminali, come le cellule staminali del midollo osseo umano, le cellule staminali embrionali (ESC) e le cellule staminali derivate adipose (ASC) sono state segnalate come "bioink". A causa delle loro caratteristiche le cellule staminali hanno un potenziale di differenziazione multilineare e capacità di auto-rinnovamento, la struttura cutanea può essere costruita utilizzando cellule staminali epidermiche in grado di generare costrutti della pelle come follicoli piliferi, ghiandole sudoripare ecc. Le cellule staminali possono anche essere utilizzate per rigenerare il tessuto cutaneo verso la rete vascolare, la differenziazione di cellule e ricreare la biologia cellulare e tissutale. Pertanto, le cellule staminali hanno la potenziale capacità di stampare la vera integrità strutturale e funzionale del sostituto cutaneo. La stampa con cellule staminali ha un alto tasso di sopravvivenza delle cellule, è

stato riferito che i tassi di sopravvivenza delle cellule staminali prima e dopo la bioprinting 3D sono rispettivamente del 97% e del 94%, che garantiscono efficacemente il possibile utilizzo di questa tecnica per la guarigione delle ferite [18].

2.3 I BIOMATERIALI

La selezione del materiale è uno dei passaggi chiave della Bioprinting 3D. I biomateriali sono un gruppo di materiali che sono biocompatibili e biodegradabili. Poiché il tipo più comune di materiali utilizzati è il polimero, vengono anche chiamati biopolimeri. In base alla loro fonte di produzione, possono essere ampiamente divisi in due gruppi, ovvero polimeri naturali e polimeri sintetici.

2.3.1 BIOPOLIMERI NATURALI

I biopolimeri naturali sono quelli presenti in natura, tra cui le proteine (come collagene, gelatina, albumina, trombina, fibrinogeno, ecc.) e i polisaccaridi (come chitosano, chitina, cellulosa, ecc.). Biocompatibilità, biodegradabilità, idrofilicità, ottime caratteristiche biologiche, somiglianza con l'ECM nativa sono forti ragioni per cui i polimeri naturali sono preferiti nelle applicazioni di ingegneria dei tessuti. I polimeri naturali come collagene, fibronectina, elastina, fibrina, seta, alginato, chitosano o GAG, sono tipicamente non citotossici e raramente generano una risposta infiammatoria, rendendoli quindi i primi candidati per i modelli di pelle 3D in vitro [3].

Questi idrogel sono soggetti a degradazione enzimatica e dunque instabili per la coltura cellulare a lungo termine. Per tale motivo, vengono implementate tecniche aggiuntive per migliorare la resistenza meccanica degli scaffold naturali come la reticolazione, un processo il cui scopo è quello di irrigidire e rendere più stabile in condizioni fisiologiche nel tempo l'idrogel naturale prima o dopo il processo di bioprinting [10]. La tempra dei polimeri dopo la bioprinting può essere ottenuta utilizzando metodi di reticolazione fisica o chimica ad esempio utilizzando componenti reattivi come la glutaraldeide o la fusione di prodotti naturali come GAG o fibrina. Metodi di reticolazione chimica come enzimatico (ad es. Tirosinasi di funghi per gelatina), uso di acido tannico (per reticolazione del collagene), cationi bivalenti come ioni calcio (per alginato) sono stati ampiamente utilizzati. Metodi di reticolazione fisica come il trattamento con ultravioletti (ad es. Per la gelatina metacrililica (GelMA) sono anche usati per stabilizzare il costrutto bioprintato carico di cellule [6].

Un ulteriore metodo utilizzato per irrigidire gli idrogel di collagene di derivazione naturale è la glicazione non enzimatica, in base alla quale le proteine sono reticolate riducendo gli zuccheri (come il glucosio) durante diverse modifiche chimiche. Lo svantaggio di questo metodo è che l'eccesso di zucchero produce un ambiente iperosmotico citotossico che impedisce l'incorporazione delle cellule durante la formazione del gel.

Oltre al potenziale di correzione dei problemi associati alla contrazione dell'idrogel e alla reticolazione chimica, il bioprinting consente anche l'integrazione diretta di cellule, molecole bioattive e materiale di scaffold, principalmente idrogel, in modalità strato per strato. Inizialmente, i materiali dell'impalcatura utilizzati per la bioprinting degli idrogel, con la capacità di supportare la crescita cellulare 3D, includevano i polimeri naturali collagene I, alginato o Matrigel e quindi fu coniato il termine "bioink" [5].

I progressi nella bioprinting hanno portato allo sviluppo di bioink su misura che offrono proprietà di stampa ottimali mantenendo la compatibilità cellulare. Inoltre, la bioprinting offre la possibilità di co-stampare biomateriali con diverse proprietà meccaniche per aumentare la stabilità dello scaffold.

Nel corso del tempo sono state testate diverse combinazioni di polimeri naturali per il raggiungimento di scaffold precisi per la riproduzione della struttura cutanea in laboratorio. A esempio miscele di gelatina, alginato e fibrina per generare un modello di pelle a tutto spessore con una caratteristica epidermide stratificata [19], oppure miscele di alginato e chitosano che hanno prodotto interessanti risultati [20].

Vediamo ora i principali componenti naturali che vengono impiegati per generare idrogel adatti all'accoppiamento con cellule e biomateriali visti in precedenza per la generazione di bioink funzionali per la 3D bioprinting di tessuto cutaneo ingegnerizzato.

- La fibrina

La fibrina è una proteina con eccellente biocompatibilità e proprietà biologiche. Si trova naturalmente nel sangue e ha mostrato caratteristiche uniche come agente emostatico dopo una lesione e come supporto strutturale per la guarigione della ferita. Il principale vantaggio dell'utilizzo della fibrina sono i suoi siti di legame cellulare naturale, che non richiedono ulteriori modifiche chimiche. Negli ultimi anni, la fibrina è stata utilizzata come biomateriale iniettabile per la formazione in situ di ECM 3D contenente diversi tipi di cellule come cheratinociti, fibroblasti e cellule staminali mesenchimali. Tuttavia, potrebbe non avere un effetto evidente sull'epitelizzazione. Rispetto al collagene, la fibrina fornisce una matrice extracellulare dalle proprietà meccaniche molto migliori, che può essere utilizzata per la crescita e la differenziazione a lungo termine dei cheratinociti. La formazione di un'epidermide regolare su uno scaffold di fibrina applicata a veri e propri equivalenti cutanei è più veloce e meglio organizzata. Pertanto, il modello stabile in vitro preparato usando la

fibrina sarà adatto a chiarire i meccanismi regolatori delle interazioni cellula-matrice e cellula-cellula [3] [1] [10].

- Il collagene

Il collagene è una delle proteine più abbondanti nei tessuti umani. A causa della sua prevalenza nella pelle (~ 70% delle proteine corporee), della sua scarsa tossicità e dell'eccellente biodegradabilità, è sempre stato ampiamente utilizzato per applicazioni di ingegneria della pelle [9] [5]. Il collagene fornisce supporto strutturale e biologico alle cellule attraverso la sua struttura fibrosa contenente sequenze di arginina-glicina-aspartico (RGD) fondamentale per l'adesione cellulare [3]. Il collagene di tipo I, come componente principale della matrice extracellulare cutanea (ECM), è il componente polimerico naturale più comunemente usato nella pelle ingegnerizzata. In particolare, la capacità di estrarre il collagene da fonti naturali lo rende un candidato alla matrice attraente e fisiologicamente rilevante. Sfortunatamente, il collagene e altri biopolimeri hanno tipicamente proprietà meccaniche deboli a causa dell'elevato contenuto di acqua. Ad esempio, il collagene I è suscettibile alla contrazione fisica quando i fibroblasti integrati esercitano forze sulla matrice. Questa contrazione può essere ridotta dalla rimozione di acqua dallo scaffold mediante compressione fisica. Sebbene il collagene sia stato impiegato per la riparazione delle ferite e la rigenerazione dei tessuti, la sua rapida degradazione e la conseguente struttura meccanica instabile hanno causato esiti indesiderati [8]. Per ridurre il tasso di degrado e migliorare la stabilità meccanica degli scaffold di collagene sviluppati mediante tecniche convenzionali (es. Fusione di scaffold di collagene spugnoso) o di fabbricazione rapida (ad es. Bioprinting 3D ed elettrospinning), i ricercatori hanno impiegato metodi di reticolazione biocompatibile e/o una rete polimerica ben progettata all'interno della matrice di collagene. Tuttavia, i tessuti cutanei bioingegnerizzati a base di collagene sono ancora i modelli più comunemente impiegati per imitare la pelle sana e malata in vitro [3].

- La gelatina

La gelatina è la forma irreversibilmente denaturata di collagene ottenuta attraverso idrolisi parziale ed è stata ampiamente utilizzata per l'ingegneria dei tessuti. La gelatina presenta una minore antigenicità rispetto al collagene. Soffre di bassa resistenza meccanica. Per risolvere questo problema, è stato incorporato con altri polimeri (ad esempio policaprolattone (PCL), poli (acido lattico) e chitosano) o reticolato attraverso processi chimici o agenti foto-reticolanti. L'applicazione della gelatina per l'ingegneria del tessuto

cutaneo ha mostrato risultati promettenti nella promozione dell'epitelizzazione nella guarigione delle ferite [3] [10].

- Chitosano

Il chitosano è stato ampiamente utilizzato per l'ingegneria della pelle dove la sua influenza positiva sulla proliferazione e adesione dei cheratinociti e dei fibroblasti. Tuttavia, simile ad altri idrogel, soffre di basse proprietà meccaniche e gelificazione lenta, pertanto dovrebbe essere miscelato/copolimerizzato con gli altri polimeri o reticolato [3].

- Alginato

I motivi principali della popolarità dell'alginato sono la sua gelificazione a basso costo, semplice e veloce e la non immunogenicità, che lo rendono adatto a coprire i tessuti dopo un intervento chirurgico di donazione della pelle. L'alginato modificato chimicamente può migliorare notevolmente la stabilità meccanica della struttura 3D e il suo composito a doppia rete con polimeri sintetici come il polietilenglicole dimetacrilato (PEG-DA) possono fornire architetture 3D resistenti e bio-stampabili con sopravvivenza cellulare a lungo termine [4].

2.3.2 I BIOPOLIMERI SINTETICI

I biopolimeri sintetici sono polimeri artificiali che includono acido polilattico (PLA), acido poliglicolico (PGA), poli (ϵ -caprolattone) (PCL), poli (acido lattico-co-glicolico) (PLGA), poli (propilene fumarato), polianidridi, policarbonati, poliesteri, poliuretani e polifosfeni. I biopolimeri sintetici sono noti per le loro eccellenti proprietà meccaniche. I vantaggi dell'utilizzo di polimeri sintetici risiedono nelle loro proprietà fisiche regolabili (ad esempio porosità, biodegradazione e rigidità/elasticità) per adattarsi ad applicazioni specifiche. Tuttavia, poiché i polimeri sintetici in genere hanno scarse proprietà adesive sulle cellule, vengono regolarmente utilizzati in combinazione con polimeri naturali [10].

2.3.3 I BIOPOLIMERI COMPOSITI

Entrambi i tipi visti presentano alcuni limiti. I biopolimeri naturali, nonostante abbiano il più grande vantaggio di imitare l'ECM dei tessuti nativi, soffrono di scarse proprietà meccaniche. D'altra parte, i biopolimeri sintetici hanno il vantaggio di migliori proprietà meccaniche ma molto diversi dall'ECM naturale. E quindi, i ricercatori usano polimeri compositi, che hanno componenti sia di biopolimero naturale che sintetico, combinando così i vantaggi di entrambi e compensando i limiti degli uni con le proprietà degli altri e viceversa. Questo è

estremamente importante con la bioprinting 3D perché, oltre ai requisiti di base di un biopolimero, c'è un altro fattore importante da considerare durante la preparazione del bio-
inchiostro, ovvero la stampabilità. Un idrogel prodotto con seta reticolata e collagene è stato descritto come un biomateriale dermico ideale [21]. Questa combinazione consente di preservare i domini che legano le cellule dal collagene beneficiando delle proprietà stabilizzanti della seta, che si sono dimostrate più resistenti alla degradazione e alla contrazione dipendenti dal tempo rispetto agli idrogel di collagene. Inoltre, l'uso di tecniche avanzate di biofabbricazione, come la bioprinting, può anche ridurre i problemi associati alla contrazione e alla reticolazione chimica. E' stato riportato che la miscelazione di PLACL con gelatina ha creato impalcature nanofibrose elettrofilate di proprietà meccaniche favorevoli, con gelatina che offre flessibilità mentre PLACL contribuisce alla resistenza alla trazione. Anche la stampa di idrogel di alginato su un supporto PCL ha aumentato significativamente il modulo di Young del costrutto stampato complessivo [22]. Allo stesso modo, è stato dimostrato che le impalcature PCL migliorano la resistenza meccanica di un costrutto a base di collagene e aiutano a ridurre il restringimento del collagene. Tuttavia, ci sono anche alcune potenziali sfide e svantaggi associati a questi polimeri sintetici come la scarsa biocompatibilità, la perdita di proprietà meccaniche e la generazione di sottoprodotti tossici durante il degrado. Il suo degrado nel tempo potrebbe anche comportare alcuni problemi poiché il PCL impiega 1,5-2 anni per degradarsi. Il substrato con tempo di degradazione molto lungo (o resistenza alla trazione molto elevata) può rimanere nel letto della ferita per un periodo prolungato dopo la rigenerazione e ostacolare lo sviluppo di nuovi tessuti.

I requisiti di un biomateriale ottimale sono biocompatibilità con i tessuti, biodegradabilità al tasso ideale corrispondente al tasso di formazione di nuovi tessuti, non tossicità, non immunogenicità, proprietà meccaniche ottimali, porosità e morfologia adeguate per il trasporto di cellule, gas, metaboliti, nutrienti e segnale molecolare sia all'interno del biomateriale e tra il biomateriale e l'ambiente locale e stampabilità. La classificazione dei biomateriali per bioprinting avviene inoltre anche in base ad altre due caratteristiche: reologia, che comprende viscosità, assottigliamento e stress da snervamento e meccanismi di reticolazione degli idrogel, ovvero fisico, ionico, chimico, reticolazione stereocomplessa o termica. Si definiscono, inoltre, 'intelligenti' biopolimeri idrogel che presentano reattività a vari stimoli esterni come pH, temperatura, luce, campo elettrico e magnetico. La selezione del materiale è la chiave per qualsiasi processo di bioprinting [3] [10] [5].

Nella seguente tabella vengono riportate le caratteristiche che devono essere soddisfatte dai biopolimeri e idrogel per poter essere utilizzati nella tecnica della 3D bioprinting o che influiscono in maniera significativa sulle proprietà finali del prodotto bioprintato:

Stampabilità	Viscosità Proprietà di assottigliamento Tempo di risposta e transizione Stimolo di transizione sol-gel
Biocompatibilità	Degradabilità Motivi di legame cellulare Non tossicità Non-immunogenicità
Proprietà meccaniche	Rigidità Elasticità Forza
Forma e struttura	Dimensione dei pori Struttura micro-macro

Per la bioprinting 3D della pelle, è disponibile un'ampia gamma di biopolimeri naturali, sintetici e compositi, che possono essere selezionati in base al tipo di processo di stampa utilizzato e la formulazione di bio-inchiostro può essere eseguita con o senza cellule, in base all'approccio che si intende utilizzare e che si ritiene più adeguato. Con lo sviluppo di idrogel intelligenti, la bioprinting 3D di pelle funzionale non sarà più solo un sogno, ma un obiettivo realistico che può essere raggiunto nel prossimo futuro. Dopo aver esaminato i tipi di cellule che possono essere utilizzate per i sostituti della pelle, la bioprinting 3D ha il lusso di utilizzare qualsiasi tipo di cellula o combinazione di cellule, sospesa nella stessa soluzione o bio-inchiostro o cellule diverse in diversi bio-inchiostri. In base al tipo di cellule scelto, la composizione del bio-inchiostro varia al fine di soddisfare i requisiti di base di un bio-inchiostro stampabile [3].

2.4 IL BIOINK

Il bioink è il mezzo di consegna che incapsula le cellule, minimizza le lesioni delle cellule durante il processo di stampa e fornisce un microambiente di supporto per la maturazione della pelle bioprintata. La scelta del bioink è un aspetto critico del bioprinting, essenziale per le diverse cellule da depositare in schemi specifici dei modelli CAD ed è scelta tenendo conto delle caratteristiche biomeccaniche desiderate. Una scelta appropriata di bioink è essenziale per fornire gli spunti chimici e fisici che facilitano le interazioni cellula-ECM necessarie [3] [8] [10] [5] [7]. Le proprietà del bioink non solo influenzano la crescita cellulare, la proliferazione e la differenziazione, ma anche la struttura e la funzione della pelle bioprintata. È essenziale che il bioink scelto sia biocompatibile e di supporto cellulare e faciliti la differenziazione funzionale delle cellule nella pelle. Talvolta il bioink può servire come materiale di supporto sacrificale che viene rimosso immediatamente dopo la stampa o come materiale di supporto meccanico che fornisce caratteristiche meccaniche specifiche al tessuto [6]. I bioink possono essere materiali completamente naturali come collagene, fibrina, HA e alginato, o materiali sintetici come PCL, polilattide (PLA), poliglicolide (PGA), poli (lattico- polimeri di acido co-glicolico) (PLGA) e polietilenglicole (PEG) o biomateriali ibridi che contengono una combinazione di materiali naturali e sintetici, che potrebbero fornire supporto meccanico [1]. Altri bioink che vengono tipicamente utilizzati includono anche bioink a base di agarosio, seta, cellulosa e GelMA. Materiali come Pluronic F-127 potrebbero essere utilizzati come materiali di supporto sacrificale che tengono insieme le cellule durante la stampa e potrebbero essere semplicemente lavati via dopo la stampa del costruito tissutale [5].

- **Caratteristiche che deve avere il bioink**

La stampabilità del bioink indica la facilità con cui potrebbe essere stampato con una buona risoluzione e la capacità di mantenere la sua struttura per la maturazione della pelle post-stampa. La formulazione del bioink dovrebbe essere abbastanza stabile da fornire stabilità architettonica al costruito cutaneo. La fedeltà della forma e la risoluzione di stampa sono considerazioni importanti nella valutazione della stampabilità del bioink. Altre importanti proprietà del bioink da considerare includono cinetica di gelazione, caratteristiche reologiche e proprietà dei materiali. Idealmente, la viscosità del bioink dovrebbe essere tale non solo da favorire la crescita e la differenziazione delle cellule, ma anche adatta alla stampa, ma in realtà le viscosità appropriate per il bioprinting potrebbero non supportare la vitalità delle cellule. Pertanto, per ottenere una buona stampabilità e allo stesso tempo

garantire un'elevata vitalità delle cellule, è necessario ottimizzare le condizioni di stampa e la coerenza del bioink. Le caratteristiche biomeccaniche e strutturali della pelle sono anche importanti considerazioni per la scelta del bioink. L'obiettivo sarebbe quello di creare una sorta di bioink standard o universale che potrebbe supportare diversi tipi di tessuto senza comprometterne la funzionalità. Un altro fattore importante da considerare è la velocità con cui il materiale si degraderà nel corpo nel tempo: le cellule dovrebbero essere in grado di degradare l'impalcatura a un ritmo che corrisponda alla loro produzione di ECM e attività di rimodellamento [6] [3] [10].

2.5 APPROCCIO SCAFFOLD FREE

E' doveroso, comunque, citare anche un'altra tipologia di approccio completamente diversa nella generazione di pelle ingegnerizzata, che non utilizza scaffold per creare la struttura sulla quale andranno ad essere seminate le cellule scelte: l'approccio scaffold free [23] [24]. I modelli privi di architetture di tessuti 3D, sferoidi, sono definiti come aggregati cellulari prodotti dall'autoassemblaggio di uno o più tipi di cellule. Gli sferoidi, chiamati anche microtessuti, si autoassemblano per forza di gravità da cellule monodisperse e replicano molte caratteristiche dei tessuti di organi e tumori, tra cui la deposizione di proteine della matrice extracellulare (ECM), interazioni cellula-cellula, nonché la formazione di nutrienti, rifiuti e gas Gradienti (O₂ e CO₂) [3]. L'utilizzo di un modello di pelle 3D senza impalcature è vantaggioso per via di bassi costi e riproducibilità. Tali modelli sono adatti per funzioni cellulari ad alto rendimento, citotossicità o analisi biochimiche. L'applicazione principale dei costrutti generati utilizzando questo approccio risiede nello sviluppo di farmaci anticancro e nella valutazione tossicologica. A questo proposito, la bioprinting offre la possibilità di standardizzare la deposizione di microrganismi mediante l'esatto posizionamento degli sferoidi nei modelli di pelle ingegnerizzata. Gli sferoidi cellulari sono "privi di impalcature" e dipendono dalla tecnica di sospensione magnetica. Gli sferoidi formati possono variare di dimensioni, a seconda dei parametri impostati dall'utente. La loro completa funzionalità biologica dipende direttamente dalle cellule che secernono il proprio componente ECM, seguendo le vie di segnalazione per l'istogenesi e il processo di localizzazione [23] [24]. L'approccio progettuale dovrebbe basarsi sulla gravità della lesione. Se la ferita o l'ustione è una lesione di spessore parziale, l'innesto cutaneo dello strato epidermico dovrebbe andare bene. Quando la gravità della lesione è di grado più elevato, è richiesta una struttura a più strati. Se l'area della ferita da trattare è più piccola, possono essere accettabili metodi privi di impalcature rispetto alla più ampia area della ferita, dove è necessario un approccio basato su impalcature per facilitare la migrazione cellulare, formando ammassi e giunzioni cellula-cellula e infine la formazione di tessuti [6] [3].

2.6 3D BIOPRINTING

Costituisce la seconda fase del processo produttivo, la fase di processing [3], che inizia successivamente alla fase di pre-processing.

Per la bioprinting i file di stampa che contengono informazioni accurate sulla superficie di geometrie 3D complesse vengono convertiti nel formato di file STereoLithography (STL) con coordinate per il percorso della testina di stampa. Questi file contengono informazioni accurate sulla superficie necessaria per ricostruire il complesso modello 3D e possono essere progettati utilizzando interfacce utente grafiche CAD-CAM o creati da immagini cliniche con input da imaging a risonanza magnetica (MRI) e tomografia computerizzata (CT). I percorsi per le testine di stampa vengono creati tagliando il modello STL in strati e creando percorsi utensile per bioprinter che tracciano il perimetro e le caratteristiche interne di ogni sezione. Lo spessore di ciascuna di queste sezioni determina la risoluzione della stampante ed è generalmente compreso tra 100 e 500 μm . La risoluzione è specifica per la stampante utilizzata; minore è la risoluzione, migliore è la qualità ma maggiore è il tempo di stampa. La bioprinter legge i file STL e deposita strato per strato il bioink per costruire il tessuto o l'organo 3D dalla serie di sezioni 2D [3].

Le informazioni vengono trasformate in segnale elettrico per controllare la stampante per stampare i tessuti. La tecnologia di bioprinting è una tecnica di costruzione additiva ed ha il potenziale per creare direttamente architetture su macroscale graduate per imitare meglio la matrice extracellulare naturale (ECM), aumentando così l'attaccamento e la proliferazione di più tipi di cellule contemporaneamente [10].

La bioprinting si è evoluta dalla stampa 3D ed è stata sviluppata la stampa simultanea di matrice e cellule biomateriali, ovvero del bioink. La semina post-stampa delle cellule potrebbe comportare una distribuzione non omogenea delle stesse all'interno dell'impalcatura. Ciò può anche influire sulla loro attività, proliferazione e differenziamento e determinare una crescita dei tessuti tale da rendere difficile avere il controllo sulle cellule o sullo sviluppo dei tessuti stessi. Pertanto, una miscelazione omogenea di cellule in un idrogel adatto per formare un bioink e la stampa successiva evita tali problematiche. Sono stati proposti diversi metodi di miscelazione di cellule ed idrogel per la formulazione del bioink come ad esempio quello illustrato da Thayer et. al [25], ovvero la tecnica dell'unità di miscelazione passiva che è risultata essere notevolmente migliore rispetto alle tecniche di

agitazione e mescolamento tradizionali per quanto riguarda la vitalità cellulare dopo la miscelazione. Inoltre, la semplificazione del processo di miscelazione utilizzando l'unità di miscelazione riduce al minimo il numero di fasi di manipolazione e consente una migliore coerenza nell'entità della miscelazione. In definitiva, ciò si traduce sia in una migliore riproducibilità del costrutto cutaneo sia nella distribuzione cellulare più omogenea all'interno del bioink. Tale tecnica di miscelazione si è dimostrata molto flessibile per fabbricare diversi tipi di tessuto.

Con l'uso di approcci avanzati di bioprinting 3D, è possibile avere un controllo preciso sulle proprietà fisico-meccaniche e biologiche della struttura risultante. Il controllo della porosità e dell'interconnettività dei pori nei sostituti della pelle, che rappresenta una grande sfida può essere aggirato dal bioprinting. Oggi, con l'utilizzo di bioprinter computerizzate, è possibile ottenere una deposizione precisa di cellule e biomateriali, scaffold carichi di cellule con architetture predeterminate. Con metodi così precisi, è anche possibile pianificare e incorporare reti vascolari, follicoli piliferi e ghiandole sudoripare nei costrutti sviluppati per migliorare la funzione dei tessuti e l'estetica dopo l'impianto [11].

Il bioprinting consente l'implementazione di nuovi approcci nel trattamento e nella cura del paziente, ad esempio i chirurghi possono avere il controllo sull'impianto cellulare/costruttivo su scala micrometrica e millimetrica con l'aiuto di stampanti robotizzate automatiche. A differenza delle tecnologie convenzionali per la fabbricazione di scaffold, la bioprinting 3D consente la fabbricazione di strutture tissutali su misura o personalizzate. Questo aiuta a depositare i tipi cellulari desiderati con biomateriali selezionati e sostanze bioattive desiderate. Gli innesti su misura sono estremamente essenziali soprattutto nella ricostruzione della pelle con complicata topografia come orecchie e seno. La bioprinting consente di trattare la struttura con architettura, forma e quantità esatte per adattarsi al difetto [6].

La bioprinting può essere eseguita in vitro o in situ. Se viene eseguita in vitro, dopo la maturazione dei tessuti, i costrutti dei tessuti bioprintati vengono utilizzati per l'impianto o per i test in vitro. La fase finale della bioprinting è la fase di maturazione. Ciò è particolarmente critico in caso di bioprinting in vitro e, immediatamente dopo la stampa, i costrutti della pelle sono fragili e devono essere fatti maturare in un bioreattore per alcuni

giorni prima dell'uso per il trapianto. Quando la pelle è bioprintata in situ, la maturazione avviene sul corpo nel sito della lesione [3].

A seconda dell'organo da stampare, la popolazione cellulare locale viene isolata tramite biopsia e coltivata per raggiungere il numero di cellule desiderato. Nel caso di pelle sana, le cellule primarie potrebbero essere isolate, espanse e utilizzate. Tuttavia, nel caso di pelle lesa, potrebbe essere necessario differenziare le cellule staminali in cellule epidermiche e mesenchimali. Le cellule staminali possono essere ottenute da diverse fonti tra cui cellule staminali pluripotenti adipose, mesenchimali, perinatali e indotte [18]. Queste cellule vengono ulteriormente miscelate con uno speciale mezzo liquefatto che fornisce l'alimentazione e l'ossigeno necessari per mantenere in vita le cellule. Questo mix viene inserito in una cartuccia e la struttura viene stampata in base alla scansione medica del paziente. Il costrutto stampato verrà conservato in condizioni di vitro per la maturazione. Incapsulare cellule su biomateriali durante la bioprinting fornisce ad esse un supporto strutturale proteggendole dal possibile danneggiamento durante il processo di stampa e migliora il processo di maturazione.

Il bioink viene preparato in forma fluida e quindi immesso nella stampante in una miscela o parti separate che vengono miscelate nel corpo o nell'ugello della stampante [25]. Una delle maggiori sfide nel processo di bioprinting 3D è la selezione di materiali che forniscono la resistenza meccanica desiderata per i costrutti di tessuto pur essendo biocompatibili e stampabili. I materiali attualmente utilizzati nella bioprinting si basano principalmente su polimeri naturali come alginato, gelatina, collagene, fibrina e acido ialuronico o polimeri sintetici come acido polilattico o poliacrolattone (PCL) [1]. Rispetto ai polimeri naturali, una combinazione di polimeri sintetici con vari agenti di rinforzo, produce costrutti con eccellenti proprietà meccaniche.

La bioprinting, che implica l'uso della deposizione controllata da computer di cellule in precisi motivi geometrici tridimensionali, ha mostrato risultati promettenti nella deposizione accurata delle cellule per replicare l'anisotropia cutanea naturale piuttosto che le tradizionali tecniche di irrorazione e semina cellulare a bassa precisione. I due i principali approcci per disporre le cellule in modelli 3D sono top-down, vale a dire approccio dall'altro verso il basso, (cellule co-organizzate con scaffold biomimetici) o fabbricazione bottom-up, cioè dal basso

verso l'alto (secrezione di matrice da parte delle cellule stesse istigata da un supporto temporaneo) [3].

Gli approcci bottom-up mirano a fabbricare un tessuto complesso più grande mediante sinterizzazione biologica di blocchi di costruzione più piccoli, su scala micrometrica, imitando l'architettura del tessuto naturale. I mattoni possono essere aggregati cellulari, idrogel carichi di cellule, microsferiche polimeriche con una composizione omogenea o eterogenea. Questi blocchi più piccoli sono disposti spazialmente in 3D per formare un'architettura complessa biomimetica. La tecnologia delle lastre cellulari, che mira a costruire tessuti spessi funzionali senza l'uso di impalcature biodegradabili mediante la stratificazione di singole lastre cellulari di pochi micron di spessore e il montaggio dal basso verso l'alto di idrogel carichi di cellule sono gli esempi più comuni. Alcune delle altre tecnologie utilizzate in questo approccio sono tecniche assistite da laser come la scrittura diretta, il trasferimento diretto indotto dal laser, le stampanti a getto d'inchiostro o i sistemi Drop-On-Demand [3].

Gli approcci top-down mirano a trasformare materiali di grandi dimensioni in strutture complesse più piccole. Gli approcci top-down generalmente prevedono l'uso di scaffold biodegradabili. Le cellule sono seminate sui ponteggi, vengono aggiunti fattori di crescita per favorire la crescita e la proliferazione cellulare, di solito conservati in un bioreattore che fornisce adeguati stimoli meccanici e idrodinamici per la maturazione in un costrutto di tessuto 3D. Gel casting, processo sol-gel, replicazione della spugna polimerica, colata con solvente e lisciviazione del particolato, tecnica di separazione di fase, liofilizzazione, elettrofilatura, l'apparato selettivo di sinterizzazione laser (SLS) e stereolitografia (SLA) sono alcuni dei processi utilizzati nella fabbricazione di ponteggi biodegradabili [3].

Entrambi gli approcci hanno i loro pro e contro. Si dice che l'approccio dal basso abbia il potenziale per improvvisare la vascolarizzazione nei costrutti 3D, perfezionandoli con alberi vascolari intraorganici [4] e la fattibilità di depositare tipi di cellule multiple con l'orientamento spaziale desiderato in 3D. Tuttavia, uno dei principali svantaggi di questo approccio è l'incapacità di alcuni tipi di cellule di secernere quantità sufficienti di matrice extracellulare (ECM), migrazione delle cellule e incapacità di formare giunzioni cellula-cellula. L'approccio dall'alto verso il basso presenta molti vantaggi come la stabilità strutturale, la facilità di migrazione cellulare sulla struttura del ponteggio, formando così giunzioni cellula-cellula e

migliori interazioni cellula-cellula e disponibilità di una gamma di materiali biodegradabili e biocompatibili per la fabbricazione della struttura del ponteggio. Lo svantaggio principale è la mancanza di comprensione dettagliata dell'interazione cellula-scaffold. Le proprietà meccaniche e superficiali dell'impalcatura influenzeranno la vitalità, la crescita e la proliferazione cellulare di diversi tipi di cellule. Inoltre, se le cellule staminali vengono seminate sulle impalcature, potrebbero differenziarsi in diversi tipi di cellule in base alle proprietà dell'impalcatura. Sebbene l'approccio dal basso verso l'alto abbia il vantaggio di essere privo di impalcature, alcuni degli approcci come la bioprinting dell'estrusione comportano la fabbricazione di strutture 3D con idrogel carichi di cellule. Per motivi come aumentare la densità cellulare, le cellule possono essere ulteriormente aggiunte ai costrutti bioprintati (stampati da idrogel carichi di cellule mediante bioprinting per estrusione), dove le proprietà del costrutto bioprintato influenzano il comportamento delle cellule che vengono aggiunte. Quindi, comprendere l'interazione cellula-materiale diventa fondamentale in entrambi gli approcci [3]. La Figura 5 illustra schematicamente entrambi gli approcci.

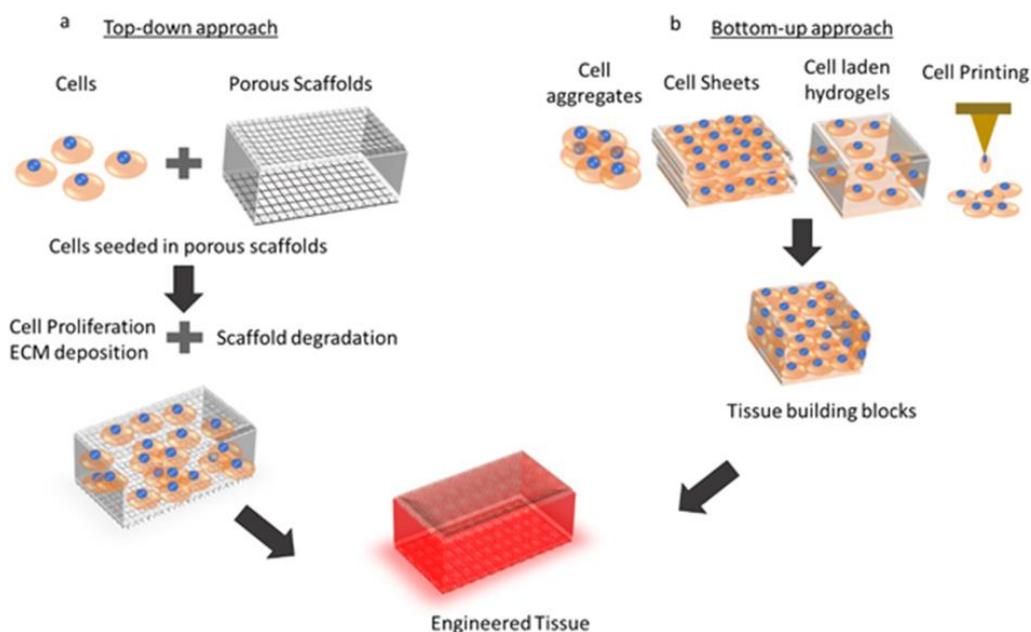


Fig.5: rappresentazione schematica degli approcci top-down (a) e bottom-up (b)

Al fine di fabbricare con successo un sostituto cutaneo bio-mimetico e perfettamente funzionante, è importante avere i vantaggi di entrambi gli approcci quindi superando i limiti nell'uso di uno di essi separatamente. L'integrazione di entrambi gli approcci bottom-up e top-down è un'idea eccellente, ancora da sperimentare per l'ingegneria del tessuto cutaneo. Con le tecnologie di bioprinting 3D sono possibili sia l'approccio bottom-up (stampanti a getto d'inchiostro/sistemi Drop-On-Demand) sia l'approccio top-down (SLS, SLA) e, di

conseguenza, l'integrazione non è impossibile. Un sistema ibrido, costituito da vari principi della bioprinting 3D, può raggiungere questa integrazione. Soprattutto per la bioprinting 3D della pelle, l'approccio dal basso può essere utilizzato per costruire ogni strato della pelle, l'epidermide o il derma e quindi questi strati possono essere uniti usando approcci top-down [3].

La vitalità cellulare può essere influenzata da diversi fattori, tra cui la tecnica di bioprinting utilizzata, la velocità di stampa e le specie di cellule seminate. Indipendentemente dalla tecnica di bioprinting 3D scelta, è probabile che la capacità di progettare con successo la pelle funzionale dipenda in gran parte dal biomateriale e dalle cellule utilizzate. Biocompatibilità, biodegradabilità, bioinerzia, resistenza, durata e duttilità sono, come già visto, alcuni degli aspetti che vengono presi in considerazione durante la selezione dei biomateriali. Ai fini della bioprinting, i biomateriali dovrebbero anche essere stampabili [10].

Le tecniche di bioprinting maggiormente utilizzate per la stampa di tessuto cutaneo possono essere classificate in quattro classi principali: bioprinting laser assistita o trasferimento diretto indotto dal laser, bioprinting a getto d'inchiostro/bioprinting basato su drop-on-demand, bioprinting tramite dispensazione/ estrusione/ deposizione robotizzata e bioprinting elettroidrodinamica, che è la tecnica di stampa 3D di materiali biologici più innovativa e recente [6] [3] [10] [11].

Analizzeremo ora nel dettaglio le varie tecniche di stampa 3D utilizzate mettendone in risalto i vantaggi, gli svantaggi e le differenze tra esse, in maniera tale da individuare quali possano essere le scelte più adeguate per la creazione del miglior costrutto di pelle ingegnerizzata in laboratorio.

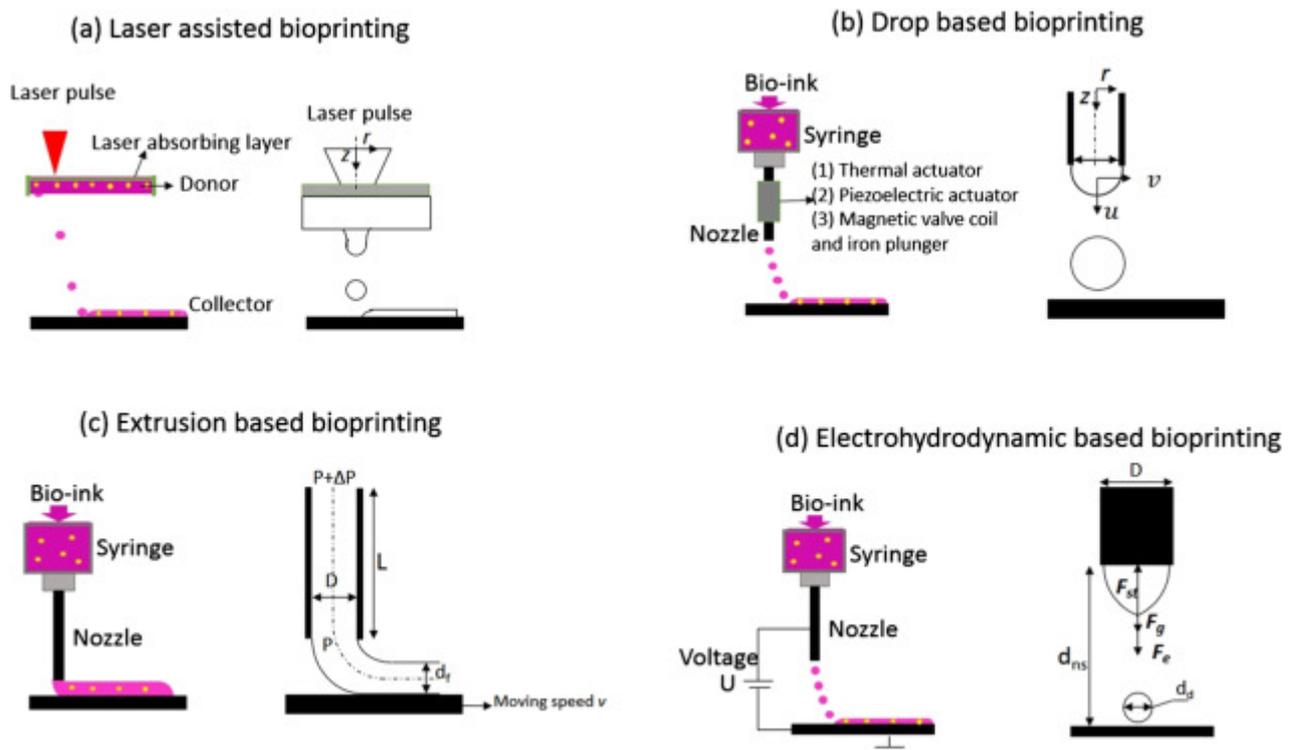


Fig.6: (a) principio di funzionamento della bioprinting laser assistita LAB (b) principio di funzionamento della bioprinting a getto d'inchiostro (c) principio di funzionamento della bioprinting per estrusione (d) principio di funzionamento della bioprinting elettrodrodinamica

- Bioprinting laser-assistita

La bioprinting laser assistita (LAB) è una stampa senza ugelli, quindi senza contatto di bioink carichi con cellule con componenti meccaniche - questo già rappresenta un notevolissimo vantaggio per la vitalità del costrutto finale - che utilizza energia laser per spingere goccioline di bioink caricato con cellule su un substrato ricevente. Esistono diversi tipi di tecniche di bioprinting laser, con lo stesso principio di base ma lievi variazioni nell'impostazione sperimentale. Le tecniche comuni utilizzate sono il laser-induced forward transfer (LIFT), absorbing film-assisted laser-induced forward transfer (AFA-LIFT), biological laser processing (BioLP), matrix-assisted pulsed laser evaporation direct writing (MAPLE DW) and laser-guided direct writing (LG DW) [3]. Il setup sperimentale è costituito da una sorgente laser, un "nastro di stampa" (o "nastro" o "vetrino del donatore") che ha uno strato che assorbe energia dal laser e uno strato di bioink carico di cellule, e un "substrato di raccolta" (o "diapositiva di raccolta"). Lo strato assorbente sul quale incide il raggio laser è solitamente metallico e il materiale più utilizzato per svolgere questa funzione è l'oro. Quando il raggio laser viene irradiato sulla diapositiva del donatore, lo strato ad assorbimento di energia assorbe l'energia del laser con conseguente evaporazione localizzata e di conseguenza, viene creata un'alta pressione di gas che spinge goccioline di

bioink carico con cellule sul substrato del collettore. Le dimensioni del voxel o delle goccioline di bioink erogate dipendono da diversi parametri di processo. Ciò include l'energia dell'impulso laser, la dimensione del punto di focalizzazione del laser, la durata dell'impulso laser, la distanza tra la diapositiva del donatore e la diapositiva del collettore, lo spessore dello strato di assorbimento di energia del laser e dello strato di bioink carico di cellule. Il numero di cellule per goccia di bioink e l'uniformità della distribuzione cellulare dipendono dalla densità cellulare, dall'omogeneità della distribuzione cellulare nel bioink e dal rivestimento del bioink carico di cellule sullo strato che assorbe l'energia del laser [6] [3][10].

Il metodo LAB presenta molti vantaggi. È un metodo privo di ugelli che elimina così il problema di intasamento degli ugelli e il rischio di contaminazione, un problema molto comune con gli altri metodi di bioprinting basati su ugelli. Alta risoluzione, capacità di stampare sospensioni cellulari e bioink ad alta densità con un'ampia gamma di viscosità (1–300 mPa/s). La capacità di posizionare piccoli volumi di sospensioni cellulari o bioink, fino a qualche centinaio di femtolitri, con alta risoluzione e capacità di stampare sospensioni cellulari ad alta densità o precursori di idrogel o bioink con qualsiasi viscosità desiderata, che è la principale limitazione con le bioprinter a getto d'inchiostro, che può gestire solo intervalli di viscosità più bassi [3].

LAB soffre anche di molte limitazioni. Sebbene LAB sia un processo senza contatto e presenti un basso rischio di contaminazione poiché il dispositivo di stampa e i substrati sono sempre separati, l'uso di uno strato metallico che assorbe l'energia laser comporta un alto rischio di contaminazione da particelle metalliche. L'alto costo e la complessità nel controllo dei sistemi laser sono altri limiti e lo svantaggio più importante di LAB è la comprensione limitata degli effetti collaterali dell'esposizione laser sulle cellule. Inoltre, LAB è un metodo a bassa produttività rispetto agli altri metodi di bioprinting e quindi l'adozione di questo metodo su scala di produzione è limitata in quanto ha un rendimento inferiore ed è più lento delle modalità di estrusione e stampa a getto d'inchiostro [3] [10].

- Come influisce il laser sulla vitalità cellulare

Zhang et al. [26] ha studiato la lesione cellulare indotta dalla bioprinting laser nei fibroblasti di topo NIH 3T3. Hanno scoperto che il tempo minimo necessario affinché le cellule raggiungano lo stadio apoptotico tardivo è di 4-5 ore dopo la stampa.

Un altro studio interessante ha studiato gli effetti della gelificazione dell'alginato, del tempo di gelificazione, della concentrazione di alginato e della influenza del laser sulla vitalità cellulare post-trasferimento dei fibroblasti NIH 3T3 (Gudapati et al. 2014 [27]). È stato osservato che gli effetti della gelazione dipendono principalmente dalla durata della gelazione. È stata osservata una gelificazione di due minuti per mantenere una maggiore vitalità cellulare dopo 24 ore di incubazione; tuttavia, una gelificazione di 10 minuti ha ridotto la vitalità cellulare a causa della formazione di una spessa membrana di gel che ostacolava la diffusione di nutrienti e ossigeno dal terreno di coltura. Hanno anche scoperto che una maggiore fluensa laser o concentrazione di alginato influiscono sulla vitalità cellulare.

- Bioprinting a getto d'inchiostro

I metodi di bioprinting basati su getto di inchiostro depositano goccioline di bioink carichi di cellule su un substrato e includono bioprinting a getto d'inchiostro, bioprinting basato su microvalvole e bioprinting basato su acustica. La bioprinting a getto d'inchiostro è sinonimo di stampa drop-on-demand (DOD) ed è preferita rispetto ai sistemi di rilascio di goccioline in maniera continua, data la capacità dei sistemi DOD di modellare con precisione i bioink carichi di cellule per imitare la struttura cellulare del tessuto nativo. Ad oggi, gli studi riguardanti la bioprinting acustica sono limitati a causa della perdita di controllo sul sistema di stampa [3].

Dei diversi tipi di tecniche di stampa a getto d'inchiostro, solo le tecniche DOD termiche e piezoelettriche sono comunemente utilizzate per la bioprinting. Nel metodo di bioprinting termico viene applicato un impulso di tensione per riscaldare il bioink che provoca un riscaldamento localizzato, si forma una bolla di vapore e una rapida espansione e disintegrazione della bolla genera una pressione all'interno del serbatoio del bioink che aiuta il bioink a superare la tensione superficiale sulla punta dell'ugello espellendo così una goccia. Nella tecnica di bioprinting piezoelettrico invece un impulso di tensione viene applicato a un cristallo piezoelettrico, il cristallo piezoelettrico si espande creando così un'onda di pressione nel serbatoio del bioink, aiutando il bioink a superare la tensione superficiale sulla punta dell'ugello, espellendo una goccia. I parametri importanti in un sistema di bioprinting piezoelettrico sono l'impulso di tensione (ampiezza, frequenza e durata dell'impulso), la modalità di attivazione dei cristalli piezoelettrici (push-pull e pull-push), la viscosità e altre proprietà reologiche del bioink [6] [3] [10].

Il sistema di bioprinting basato su microvalvole utilizza la pressione pneumatica per spingere il bioink carico di cellule fuori dall'ugello e l'apertura dell'ugello è controllata da una valvola elettromeccanica a base di solenoide. I parametri che determinano le caratteristiche delle goccioline includono la viscosità, la tensione superficiale e altre proprietà reologiche del bioink, la pressione pneumatica applicata, il tempo e la frequenza di apertura della valvola e il diametro dell'ugello.

Il vantaggio principale della bioprinting a getto d'inchiostro è la velocità raggiungibile. Recentemente, i sistemi microfluidici sono stati combinati con la stampa per estrusione per un deposito relativamente semplice di più materiali e hanno portato alla stampa ad alta velocità [3].

Mentre ci sono molti vantaggi nella tecnologia di bioprinting a getto d'inchiostro, un aspetto negativo è il rischio di esporre cellule e materiali a stress termici e meccanici e, nel caso di stampanti acustiche, l'uso di alte frequenze può influire sulla vitalità delle cellule. Le bioprinter a getto d'inchiostro sono anche limitate dalla viscosità del bioink utilizzato: più viscoso è il bioink, maggiore è la forza necessaria per espellere la goccia dall'ugello della stampante. Inoltre, la densità cellulare che può essere utilizzata per la stampa potrebbe essere inferiore ai numeri fisiologicamente rilevanti a causa dei possibili problemi di intasamento degli ugelli [3].

Oltre alla formazione di goccioline durante la bioprinting, è cruciale anche l'atterraggio della gocciolina espulsa sul substrato del collettore. L'interazione tra la gocciolina e il substrato può essere classificata come schizzi (la gocciolina si rompe in goccioline secondarie dopo l'atterraggio sul substrato) e diffusione (la gocciolina si diffonde sulla superficie). Tuttavia, gli schizzi o la diffusione di goccioline possono causare lo spostamento delle cellule dalla posizione progettata, provocando così un fallimento nella bioprinting [7].

La bioprinting a getto d'inchiostro, in particolare la bioprinting basata su microvalvole, è un processo altamente praticabile per fabbricare un equivalente biomimetico della pelle. Facilità d'uso, costi moderati e utilizzo di una gamma bassa di pressione pneumatica (quindi meno lesioni e danni alle cellule prive di difetti) rende la bioprinting basata su microvalvole una scelta naturale per la bioprinting dei tessuti molli, compresa la pelle [8].

- Come è fatta la stampante 3D per getto d'inchiostro

Per offrire la flessibilità di controllare gli ambienti geometrici micro e macro-cellulari e le interazioni cellula-cellula in 3D, Singh et. al [18] hanno sviluppato una piattaforma di bioprinting robotica basata sulla tecnologia di fabbricazione 3D a forma libera solida. Questa piattaforma è stata utilizzata e segnalata in studi precedenti [28]. E' costituita da otto canali di erogazione cellulare controllati in modo indipendente che possono posizionare con precisione cellule, matrice extracellulare (ECM), materiali di scaffold e fattori di crescita in qualsiasi modello 3D definito dall'utente. Ogni distributore è gestito in modo indipendente da valvole elettromeccaniche e montato su uno stadio robotico a tre assi, ad alta precisione e xyz. I materiali liquidi vengono erogati dalla pressione pneumatica durante la fase di apertura del cancello delle micro-valvole. Inoltre, il volume delle goccioline erogate (cioè la dimensione delle gocce) può essere manipolato controllando il tempo di apertura della valvola e la pressione dell'aria. I distributori senza contatto sono in grado di erogare cellule in volumi fino a 15 nL con elevata precisione e alta vitalità e sono compatibili con una varietà di idrogel utilizzati nell'ingegneria dei tessuti. Il volume di erogazione può essere regolato controllando digitalmente la pressione e la durata dell'impulso (100-800 μ s). Il normale funzionamento consente l'erogazione continua con una frequenza di attuazione di 1 kHz, offrendo un'elevata capacità di stampa. La risoluzione minima della stampa varia in base alla viscosità del materiale. Per i materiali acquosi (ad es. Acqua e terreni di coltura cellulare), la risoluzione minima è $\sim 100 \mu$ m ed è maggiore per i materiali viscosi (ad es. Collagene e proteine della matrice). La risoluzione può essere variata sistematicamente controllando il volume delle goccioline erogate. Un'interfaccia software intuitiva facilita la generazione su richiesta di modelli spaziali dei materiali in 3D con precisione sub-cellulare.

- Bioprinting per estrusione

3D Bioprinting per estrusione è un sistema di erogazione robotizzato che estrude il bioink carico di cellule attraverso l'ugello mediante l'applicazione di pressione dell'aria (forza pneumatica) o sistemi meccanici (pistone o vite). Questo è il più semplice di tutti i metodi di bioprinting. Convenienza, alta velocità di stampa, scalabilità, capacità di stampare una vasta gamma di bioink (idrogel, polimeri, ECM decellularizzata e aggregati cellulari) sono i principali vantaggi di questo metodo [6] [3] [10].

Le strutture stampate per estrusione vengono successivamente reticolate e fatte solidificare fisicamente o chimicamente in modo tale che possano essere combinate per creare forme

3D [1]. Le stampanti a microestruzione consentono una più ampia selezione di biomateriali poiché è possibile stampare più materiali viscosi. Un altro vantaggio è che queste stampanti possono depositare densità di cellule molto elevate. Sebbene la vitalità delle cellule possa essere inferiore a quella ottenuta con le stampanti a getto d'inchiostro, è compresa tra il 40 e l'86%, a seconda delle dimensioni dell'ugello e della pressione di estrusione utilizzata [3].

È plausibile che lo stress associato all'estrusione possa influenzare la vitalità cellulare. La principale limitazione della bioprinting per estrusione è la sua bassa risoluzione (inferiore a 50 μm) [3].

- Bioprinting elettroidrodinamica

La stampa elettroidrodinamica (EHD) è una tecnologia che viene utilizzata per modellare bioink carichi di cellule in una disposizione spaziale 3D utilizzando flussi indotti dal campo elettrico attraverso micro-ugelli. Una differenza di tensione applicata tra l'ugello e il substrato supera le forze viscoelastiche e di tensione superficiale del bioink sull'ugello, causando l'instabilità di Rayleigh-Taylor e quindi l'espulsione di gocce di bioink dall'ugello. I parametri di processo che influenzano la formazione di goccioline o getti sono la tensione elettrica applicata tra il substrato e l'ugello, la distanza tra ugello e substrato e la portata della soluzione. A seconda dell'interazione tra questi parametri, la stampa basata su EHD può essere utilizzata in diverse modalità, vale a dire modalità di gocciolamento, modalità mandrino, modalità getto oscillante e modalità cono-getto. Sebbene la stampa a base elettroidrodinamica sia stata esplorata da tempo per l'incapsulamento di cellule e microsfele, non ci sono molti studi che utilizzano il sistema per l'applicazione di stampa sui tessuti della pelle [3].

La stampa a base elettroidrodinamica presenta molti vantaggi. Rispetto agli altri processi di bioprinting infatti la stampa elettroidrodinamica è un processo ad alta produttività con alta risoluzione e un volume di carico elevato. I bioink con una vasta gamma di viscosità e con elevate concentrazioni cellulari potrebbero essere stampati con un rendimento elevato utilizzando questa tecnica [3].

Gasparini et al. [29] hanno stampato fibroblasti di topo 3T3 sospesi in soluzione di alginato al 2% (p/v) per valutare la fattibilità della stampa a base elettroidrodinamica. La vitalità cellulare 7 giorni dalla stampa era superiore al 95%. Questo lavoro è stato solo una prova dello studio concettuale e ha valutato l'influenza di vari parametri di processo sulla

dimensione delle goccioline stampate e, quindi, manca una dettagliata caratterizzazione biologica dei costrutti stampati.

	Getto d'inchiostro	Estrusione	LAB	DLP
Processo stampa	Seriale (goccia dopo goccia)	Seriale (linea dopo linea)	Seriale (goccia dopo goccia)	Parallelo continuo
Velocità	Media (mm/s)	Lenta (10-50 um/s)	Media (mm/s)	Veloce (mm/s)
Risoluzione	50 um	50 um	< 500 nm	1 um
Vitalità cellulare	> 85%	40–80%	> 85%	85–95%

- Estrusione e getto d'inchiostro

Ognuna delle diverse tecniche di bioprinting ha i suoi vantaggi e svantaggi. Un sistema ibrido di due o più metodi di bioprinting potrebbe essere creato per superare gli ostacoli del bioprinting della pelle. In uno studio recente [30], un tale sistema ibrido è stato utilizzato per stampare un modello di pelle. La bioprinting per estrusione è stata utilizzata per stampare fibroblasti cutanei umani primari sospesi in un bioink a base di collagene (formando il componente dermico) e una testa di bioprinting a getto d'inchiostro è stata utilizzata per stampare cheratinociti epidermici primari umani (formando la componente epidermica).

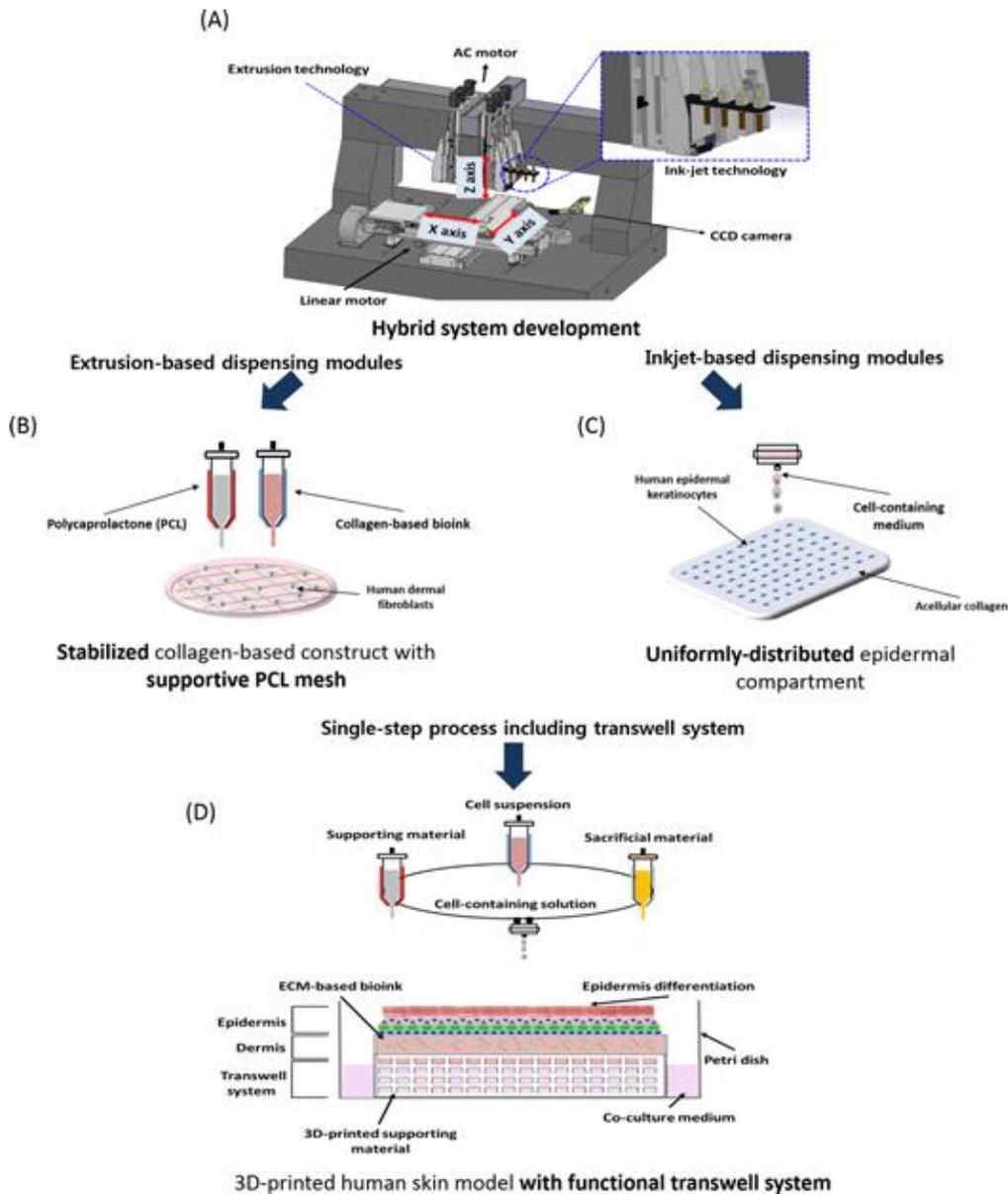


Fig.18: (A) Sviluppo di un sistema ibrido che consente l'uso simultaneo di moduli di erogazione basati su estrusione e moduli di distribuzione basati su getto d'inchiostro. (B) Fabbricazione del compartimento cutaneo 3D a base di collagene stabilizzato usando moduli di estrusione. (C) Stampa a getto d'inchiostro di cheratinociti con distribuzione uniforme mediante moduli a getto d'inchiostro. (D) Fabbricazione e maturazione del modello di pelle umana stampato in 3D con sistema di transwell funzionale, il tutto in un unico processo.

3 RISULTATI

- Bioprinting laser-assistita

Koch et al. [31] hanno riportato la vitalità cellulare, la proliferazione, l'attività apoptotica e la frammentazione del DNA delle linee cellulari della pelle (fibroblasti NIH3T3 e cheratinociti HaCaT) che sono stati bioprintati con il metodo LIFT. La vitalità post-stampa dei fibroblasti e dei cheratinociti NIH3T3 è risultata essere del $98\% \pm 1\%$ e il tasso di proliferazione era simile a quello di un costrutto creato manualmente. Nella valutazione dell'attività apoptotica post-stampata, non vi sono state differenze nell'attività della caspasi 3/7, indicativa della morte cellulare, dalle 12h alle 48h dopo il trasferimento laser. La genotossicità delle cellule post-stampate valutata utilizzando il test della cometa ha rivelato che non vi erano danni al DNA o frammentazione indotti dal processo LIFT. Questo lavoro valuta solo la vitalità delle cellule post-stampa usando il metodo LAB e non rappresenta un modello stratificato di pelle.

Uno studio successivo dello stesso gruppo [32] ha tentato di ottenere un modello 3D stratificato di pelle, usando il metodo LIFT. Un sottile strato di oro (60 nm) è stato usato come strato per l'assorbimento di energia laser. I fibroblasti NIH3T3 e i cheratinociti HaCaT sono stati sospesi nel collagene e posizionati sul vetrino del donatore. È stato utilizzato un foglio di Matriderm™ come substrato su cui è stato stampato il bioink carico di cellule. Sono stati stampati 20 strati di fibroblasti NIH3T3 nel collagene seguiti da altri 20 strati di cheratinociti HaCaT. La vitalità e la proliferazione post-stampa sono state valutate rispettivamente dalla colorazione Hoechst 33.342 e Ki67, il che ha dimostrato che le cellule erano vitali e proliferavano nel costrutto stampato nel tempo. L'adesione intercellulare è stata dimostrata dalla formazione di giunzioni aderenti e giunzioni gap tra cheratinociti, come si vede nel tessuto cutaneo nativo. Questo studio è stato uno dei primi tentativi di bioprinting di un tessuto cutaneo stratificato e la caratterizzazione biologica è stata effettuata solo dopo 10 giorni. In questo studio mancano cultura a lungo termine e ulteriore caratterizzazione biologica (produzione ECM di cellule post-stampa, ecc.).

L'esperimento è stato svolto con fibroblasti NIH-3T3 di topo albino svizzero 3D e una linea di cheratinociti umani immortalizzati, HaCaT. In breve, la configurazione sperimentale era composta da due vetrini complanari: quello superiore coperto da uno strato che assorbe il laser (uno strato d'oro sottile di 60 nm) e uno strato contenente materiale da trasferire (qui

cellule incorporate nel gel di collagene o una miscela di plasma sanguigno e alginato). Gli impulsi laser sono stati focalizzati sullo strato di assorbimento del vetrino che subisce evaporazione locale. Questo genera un'alta pressione che spinge il composto cellulare adiacente verso il vetrino inferiore. Un foglio di materiale, un'impalcatura o uno strato di gel possono essere posizionati sul vetrino inferiore per stampare celle su o al suo interno. In questo studio è stato utilizzato un foglio di Matriderm™ che è poroso e permeabile per i terreni di coltura cellulare. Il composto cell-gel viene trasferito come un getto. Il volume trasferito dipende dallo strato che assorbe il laser e dallo strato cellule-gel, nonché dall'energia dell'impulso laser e dalle dimensioni del punto laser focalizzato. In questo studio sono stati trasferiti Volumi nell'intervallo 0,1-1 nL. È stato applicato un laser Nd: YAG con lunghezza d'onda di 1.064 nm, durata dell'impulso di circa 10 ns (FWHM) e frequenza di ripetizione di 20 Hz. Una lente acromatica da 60 mm ha focalizzato gli impulsi del laser in un punto di ablazione di 45 µm di diametro. A seconda dello spessore dello strato cellula-gel (circa 60 µm) e della viscosità, l'energia dell'impulso laser è stata impostata tra 30 e 60 µJ, corrispondenti a fluenze laser comprese tra 1 e 2 J/cm². Per dimostrare la capacità della disposizione cellulare 3D, sono stati stampati strati alternati di cheratinociti HaCaT etichettati con GFP (verde) e Cherry (rosso). Per il processo di stampa 1,5 × 10⁶ cellule sono state risospese in 45 µl di un idrogel composto da 50% di alginato e 50% di plasma sanguigno umano con acido etilendiamminotetraacetico (EDTA). Il vetrino è stato fissato in un telaio metallico e montato capovolto nell'impostazione per la stampa. La lastra di vetro inferiore è stata coperta con uno strato iniziale di 60 µm di una miscela di 25% di alginato e 75% di plasma sanguigno e successivamente bagnata con una soluzione di CaCl₂ 0,1 M per la gelazione. Strati alternati di cheratinociti rossi e verdi sono stati stampati sulla lastra di vetro inferiore. Ogni strato colorato di cellule consisteva di quattro sublayer stampati. Sono stati stampati complessivamente 7 strati di colore con 28 strati secondari. In tutte le regioni si possono trovare cellule proliferanti che verificano la vitalità delle cellule stampate 10 giorni dopo la stampa.

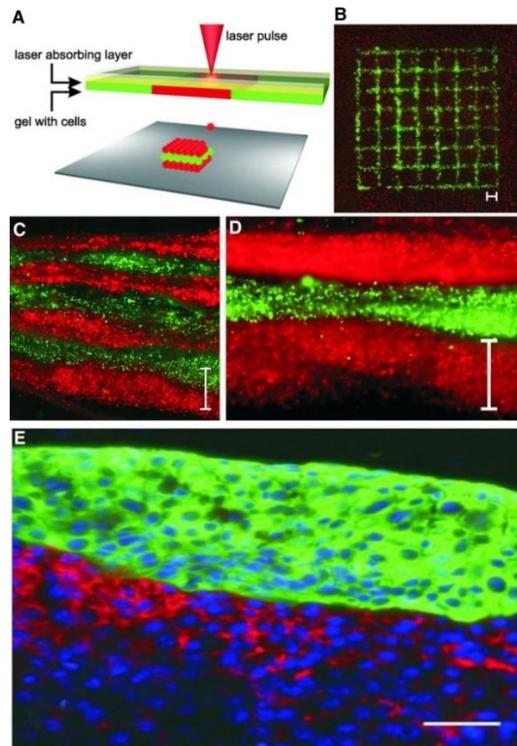


Fig.7: modello del setup della stampa laser assistita. Il complesso cellule-idrogel viene fatto cadere come un getto dalla pressione di una bolla di vapore indotta dal laser. Strato per strato viene generato un modello di cellule 3D. Una struttura a griglia stampata (vista dall'alto) di fibroblasti (verde) e cheratinociti (rosso) dimostra le capacità di micropatterning della tecnica di stampa laser. In basso: sette strati colorati alternati di cheratinociti rossi e verdi (a sinistra; dettaglio a destra). Ogni strato di colore è costituito da quattro strati secondari stampati. Una sezione istologica è stata preparata 18 ore dopo la stampa. L'intera struttura ha un'altezza di circa 2 mm e un'area di base di 10 mm × 10 mm. Le barre di scala sono 500 μm.

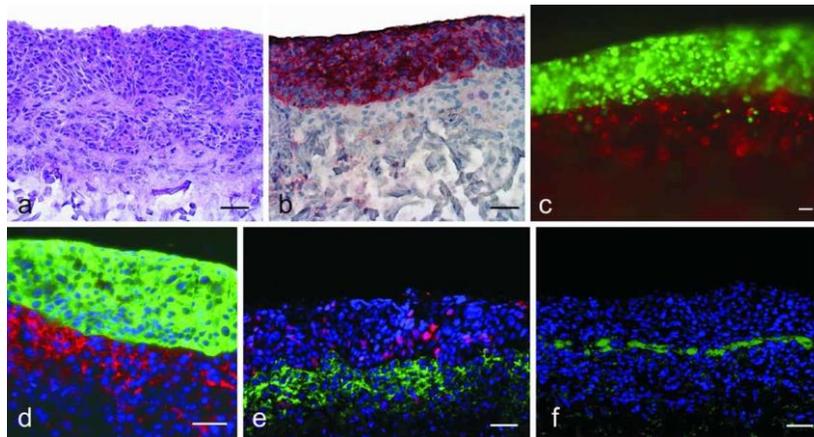


Fig.8: Struttura a doppio strato che imita la pelle: 20 strati di fibroblasti murini (NIH-3T3) e 20 strati di cheratinociti umani (HaCaT) incorporati nel collagene sono stati successivamente stampati su un foglio di Matrigel™. Tutte le barre della scala sono 50 μm. La colorazione di ematoxilina ed eosina (a) mostra tutte le cellule stampate secondo uno schema simile a un tessuto. La colorazione con immunoperidasi della citocheratina 14 in marrone rossastro (b) raffigura i cheratinociti nella struttura a doppio strato mentre tutti i nuclei cellulari (fibroblasti e cheratinociti) sono controcolorati in azzurro con ematoxilina. L'immagine (c) mostra una sezione della struttura stampata al laser, preparata direttamente dopo la procedura di stampa, con fibroblasti trasdotti (rosso) e cheratinociti (verde). Nella figura (d) i fibroblasti sono colorati in rosso (fibroblasti pan-reticolari), i cheratinociti sono colorati in verde (citocheratina 14) e i nuclei cellulari sono colorati in blu (Hoechst 33342). Soprattutto i cheratinociti formavano un'organizzazione cellulare compatta. Nella figura (e) tutti i nuclei cellulari sono colorati con Hoechst 33342 (blu), i nuclei cellulari proliferanti sono colorati con Ki -

67 (rosso) e i fibroblasti sono colorati in verde. I fibroblasti e i cheratinociti sopra sono ancora vitali e proliferanti. L'immagine (f) raffigura una colorazione anti-laminina in verde e tutti i nuclei cellulari in blu (Hoechst 33342). La laminina è un costituente principale della membrana basale della pelle.

Uno studio di follow-up di Michael et al. [33] dello stesso laboratorio ha riportato la valutazione in vivo del loro modello di pelle fabbricato usando LAB da precedenti lavori, impiegando una tecnica di camera di piega della pelle in topi nudi per esaminare la vascolarizzazione del costrutto cutaneo. Tuttavia, non è stata raggiunta la completa vascolarizzazione dei costrutti stampati che potrebbe essere dovuta alla breve durata dello studio (11 giorni). La soluzione proposta dagli autori era quella di stampare più strati di collagene carico di cheratinociti aumentando così lo spessore dello strato epidermico per generare un epitelio stratificato.

- Bioprinting a getto d'inchiostro

Lee et al. [9] hanno utilizzato una bioprinter a base di microvalvole per fabbricare una struttura multistrato fatta di idrogel di collagene, fibroblasti cutanei umani adulti primari e cheratinociti epidermici umani primari adulti. FB (HFF-1, di ATCC) e KC (HaCaT) sono stati usati per costruire il tessuto cutaneo 3D in questo studio. Entrambe le linee cellulari sono state coltivate a 37 °C in CO₂ al 5% integrata con siero bovino fetale al 15% e Penicillina/Streptomicina all'1%. Prima della stampa, FB e KC sono stati raccolti alla densità di sospensione desiderata. Sono stati quindi mantenuti come sospensioni cellulari su ghiaccio fino a quando non erano pronti per essere caricati nelle siringhe per la stampa. Il precursore dell'idrogel di collagene (coda di ratto, tipo I) è stato usato come materiale per scaffold per la stampa. Il precursore del collagene è stato diluito a 3,0 mg/mL con soluzione salina tamponata con fosfato di Dulbecco (senza calcio e magnesio) ed è stata mantenuta sul ghiaccio fino a quando non era pronta per essere caricata in una siringa (che funge da cartuccia per stampante) per essere stampata. La pressione di stampa e i tempi di apertura della valvola del distributore (durata dell'impulso) sono parametri cruciali per la corretta stampa di vari biomateriali, idrogel e cellule. Questi parametri sono stati determinati in base alla viscosità dei biomateriali da erogare. La pressione più bassa che ha mostrato un'erogazione stabile senza intasamento è stata utilizzata per la stampa di precursori di collagene e sospensioni cellulari. Valori di pressione nell'intervallo di 2,5–2,7 psi e 750 µs sono stati utilizzati come tempo di apertura della valvola per la stampa di collagene, portando a un volume di goccioline di ~52 nL. Per la stampa di cellule, sono state ottenute goccioline di 28 nL usando 1,4–1,5 psi di pressione e 750 µs del tempo di apertura della

valvola. La dimensione di ogni strato di collagene è stata mantenuta a 6 × 6 mm, mentre la dimensione per ogni strato cellulare è stata fissata a 4 × 4 mm. Uno strato di collagene è stato stampato su una capsula di Petri seguita da sospensioni di cellule FB o KC sulla parte superiore del collagene alla densità e alla spaziatura delle goccioline desiderate. I costrutti stampati di cellule di collagene sono stati quindi posti in un incubatore per un'ora e i terreni di coltura sono stati delicatamente aggiunti. Dopo 7 giorni di coltura, con cambiamenti dei media nei giorni 3 e 6, la vitalità cellulare è stata misurata mediante microscopia.

I parametri ottimali determinati dagli studi precedentemente descritti sulla stampa di singoli tipi di cellule come monostrati su collagene sono stati utilizzati per la costruzione di strutture cutanee 3D. La costruzione è stata realizzata utilizzando un approccio di fabbricazione strato per strato. La struttura della pelle stampata presenta otto strati di collagene. Questi includono sei strati di collagene alternati a tre strati di strati FB e due strati di collagene che separano gli strati FB impilati dai KC. Sono stati stampati due strati di KC per ottenere la densità cellulare desiderata all'interno dell'epidermide, come illustrato nella figura seguente. Al completamento delle fasi di stampa, la struttura composta è stata posta in un incubatore (37 °C, 5% CO₂) per 1 ora per completare la gelificazione del collagene. L'intera struttura del tessuto è stata quindi immersa nei terreni di coltura.

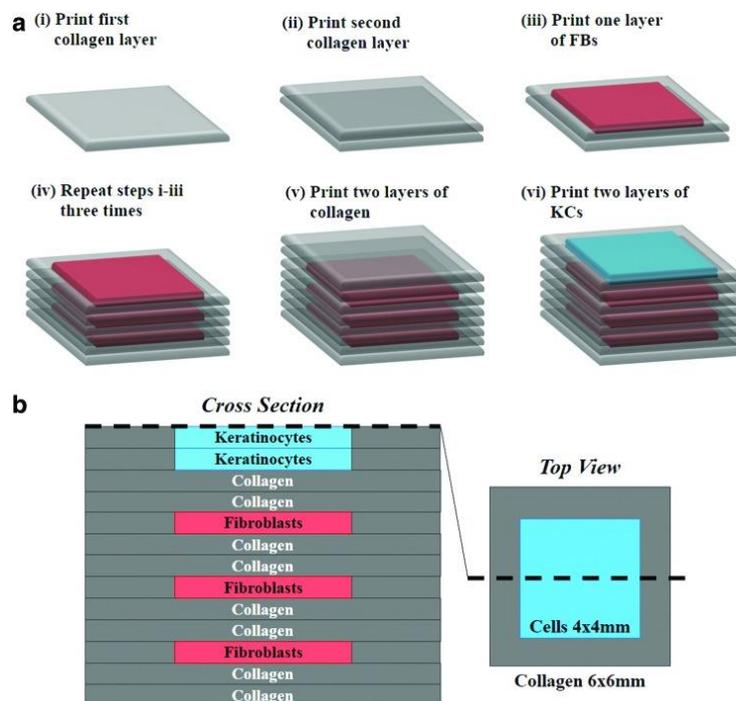


Fig.9: costruzione di tessuto cutaneo tridimensionale (3D). (a) Stampa strato per strato di matrice di collagene, KC e FB per costruire i compartimenti cutaneo ed epidermico in un'unica struttura. (b) Schema del tessuto cutaneo stampato in 3D che mostra la sezione trasversale (a sinistra) e la vista dall'alto (a destra)

Le strutture stampate sono state coltivate per 4-8 giorni in condizioni sommerse, successivamente esposte all'ALI regolando i livelli dei supporti negli inserti. Questo passaggio fa proliferare i KC e copre completamente la parte superiore della superficie del collagene. La struttura dopo 14 giorni non presentava deformazione, a differenza di quelle generate in maniera manuale che generalmente col passare del tempo presentano una forma concava come illustrato nella figura 10.

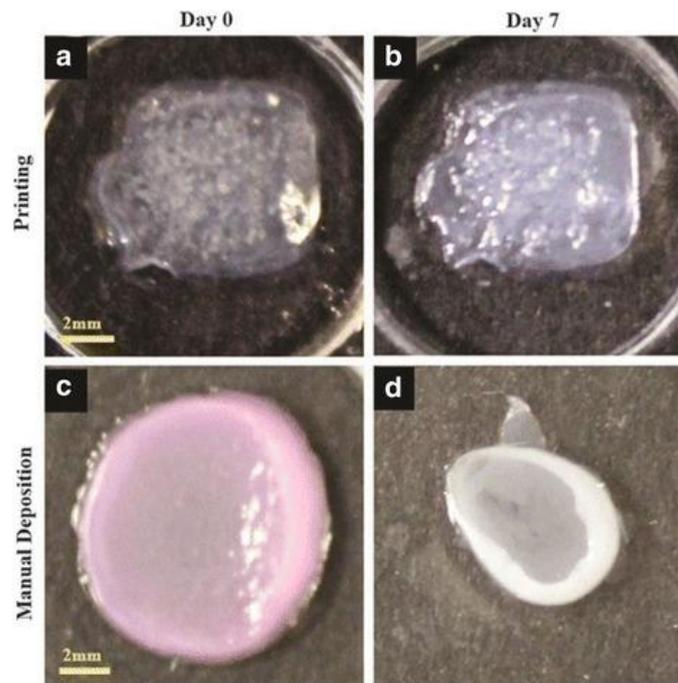


Fig.10: forma del tessuto cutaneo stampato. Un confronto tra tessuti cutanei fabbricati tramite bioprinting 3D e deposizione manuale indica che i campioni di pelle stampati (a, b) mantengono la loro forma e dimensioni, mentre le strutture depositate manualmente (c, d) si restringono e assumono forme concave (fibbia) sommerse in coltura dopo 7 giorni.

Per evitare problemi hanno utilizzato un approccio che si basa sulla stampa di cellule e proteine incapsulate nel terreno di coltura e utilizzando NaHCO_3 aerosol o nebulizzato come reticolante per il collagene. Il terreno di coltura all'interno delle gocce cellulari e proteiche fornisce una condizione tampone che protegge le cellule da potenziali danni, mentre i vapori di NaHCO_3 forniscono un approccio delicato ma efficace per ottenere la gelificazione. L'uso della leggera pressione (1,4-1,5 psi) per la stampa cellulare aiuta anche a mantenere la funzione cellulare. Le cellule stampate direttamente in due dimensioni su piastre di coltura tissutale negli esperimenti di prova presentavano identica morfologia, proliferazione e capacità di formare giunzioni strette rispetto alle cellule disposte manualmente.

La vitalità dei FB era generalmente ~98%. Analogamente ai FB, la vitalità dei KC era molto elevata, ~98%, con densità di sospensione cellulare molto elevata (2-5 milioni di cellule / mL) e spaziatura delle goccioline 200–400 μm .

Dopo l'osservazione che la vitalità cellulare era molto elevata su una gamma molto ampia di densità di sospensione cellulare e spaziatura delle goccioline, i due parametri sono stati adattati per riflettere la densità della superficie cellulare (cellule/cm²) dei KC nell'epidermide e la densità volumetrica cellulare (cellule/mL) di FB nel derma. Per rappresentare la distribuzione sparsa delle cellule all'interno del derma e la distribuzione densa delle cellule all'interno dell'epidermide, sono stati scelti come parametri di stampa per le fasi successive di questo studio 2 milioni di FB/mL e 5 milioni di KC/mL a una distanza tra goccioline di 500 μm ciascuna. Il numero di strati di collagene per il derma e l'epidermide è stato determinato in base allo spessore di un singolo strato di collagene (~140 μm) Un totale di sei strati di collagene per il derma e due strati di collagene per l'epidermide è stata stampata per ottenere gli spessori cutaneo ed epidermico desiderati.

La stampa di un singolo campione di tessuto cutaneo delle dimensioni descritte in questo studio richiede ~40 min. Tuttavia, la stampante è in grado di stampare quattro campioni contemporaneamente, il che richiede ~60 min.

La figura 11 mostra i KC densamente distribuiti nell'epidermide e i FB scarsamente distribuiti nel derma. I nuclei dei FB sono più grandi e allungati, mentre quelli dei KC sono piatti e di forma circolare come previsto. Si è scoperto che i FB erano distribuiti in modo scarso ma uniforme nella matrice del collagene, come previsto, in base alla densità di sospensione e alla spaziatura delle goccioline. L'altezza della struttura della pelle stampata variava da 1100 a 1400 μm con la maggior parte dello spessore attribuito al derma contenente i FB. I FB proliferavano all'interno dello strato dermico e mantenevano una distribuzione scarsa. I KC proliferavano più rapidamente sulla parte superiore della matrice di collagene e hanno coperto completamente la superficie in 4-7 giorni. Non è stata osservata alcuna invasione cellulare attraverso gli strati cutaneo ed epidermico. I KC a rapida proliferazione occasionalmente si espandevano oltre il bordo del tessuto stampato, tuttavia, la maggior parte delle cellule proliferanti è rimasta incorporata nella matrice del collagene. Il modello di tessuto della pelle stampato ha mantenuto la sua forma e le sue dimensioni senza ridursi durante il periodo di coltura. Al contrario, i costrutti della pelle 3D convenzionali creati dalla

deposizione manuale hanno mostrato un continuo restringimento a partire dal giorno 2 e non sono stati in grado di mantenere la loro forma.

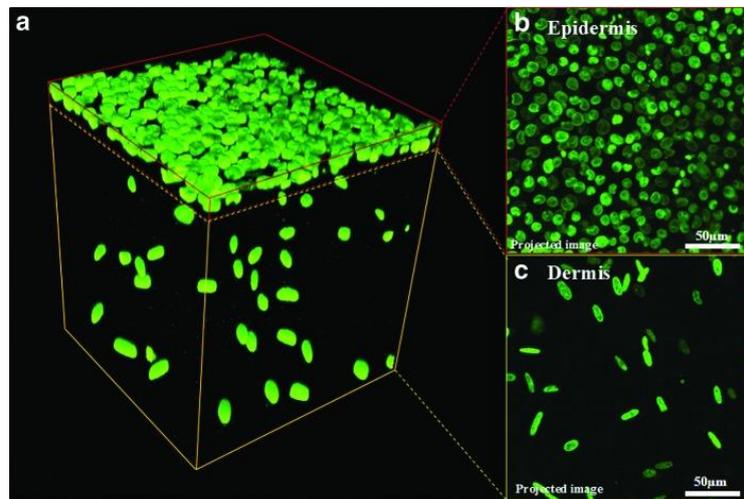


Fig.11: (a) Ricostruzione 3D delle immagini al microscopio confocale della pelle stampata dopo 7 giorni in condizioni di coltura sommersa. I nuclei delle cellule vive sono di colore verde e presentano morfologie compatte e arrotondate (KC) o grandi e allungate (FB). (b, c) Proiezioni z-compresse dell'epidermide e del derma che mostrano KC e FB.

Costrutti della pelle stampati sono stati coltivati presso l'ALI per 7-14 giorni dopo 7 giorni di coltura in condizioni sommerse. Durante questo periodo, lo spessore dei costrutti della pelle si è ridotto drasticamente a $\sim 500 \mu\text{m}$ entro le prime 24–48 ore e ha continuato a diminuire gradualmente durante il periodo di coltura a $\sim 150\text{--}200 \mu\text{m}$ entro la fine di 10 giorni come illustrato nella figura successiva. Non è stata osservata una riduzione sostanziale dello spessore della pelle su ulteriori colture per circa 14 giorni presso l'ALI. E' stato osservato anche che il tessuto cutaneo è diventato progressivamente più traslucido durante il periodo di coltura ALI, indicando la formazione dello strato corneo da parte dei corneociti formati dalla differenziazione terminale dei KC.

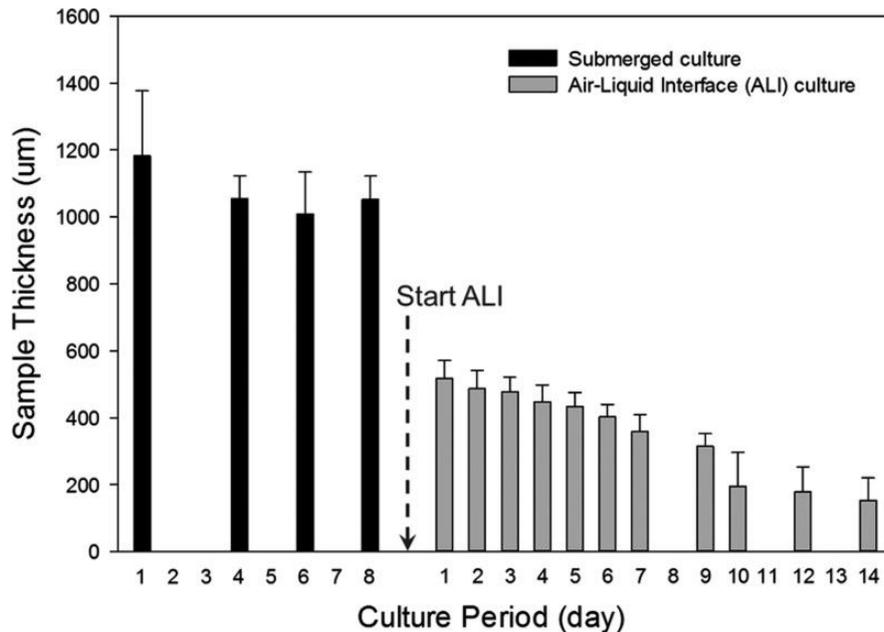


Fig.12: Spessore dei tessuti della pelle stampati. Lo spessore del tessuto varia in modo significativo nel corso del periodo di cultura (3 settimane). Una notevole riduzione (da 2 a 6 volte) dello spessore della pelle è stata osservata al passaggio da condizioni di cultura sommerse a cultura all'interfaccia aria-liquido.

I parametri chiave di stampa, tra cui la densità di sospensione cellulare e la risoluzione spaziale, sono stati quindi ottimizzati per riprodurre in modo specifico l'organizzazione e la distribuzione cellulare osservate nella pelle umana in vivo. Una cultura in due fasi che inizia con condizioni sommerse per 7 giorni e successiva esposizione all'ALI per 10-14 giorni è stata sufficiente per generare efficacemente i tre strati distinti di derma ed epidermide vitali e lo strato corneo differenziato terminalmente, sebbene incompleto come notato più tardi. Il tessuto cutaneo completamente maturo mostrava 3-7 strati cellulari distinti nell'epidermide, suggerendo la stratificazione dell'epidermide nei suoi sottostrati. La presenza di giunzioni strette tra i KC nell'epidermide indicava una barriera ben formata con estesi contatti cellula-cellula. In questo modello, la complessità della situazione in vivo non è completamente replicata. Manca la grande eterogeneità cellulare cutanea e le reti di vasi linfatici e sanguigni che sono fisiologicamente rilevanti e presenti in vivo.

Binder et al. [34] hanno dimostrato la fattibilità della bioprinting in situ sul difetto dorsale dei topi atimici utilizzando un sistema di erogazione a getto di inchiostro. Questi ricercatori hanno caricato cheratinociti umani e fibroblasti nella stampante per la pelle e hanno stampato le due cellule su un difetto della pelle a tutto spessore (3 cm × 2,5 cm). Il precursore di fibrinogeno/collagene idrogel contenente fibroblasti ($1,0 \times 10^5$ cellule/cm²) era il primo strato e un altro strato di cheratinociti ($1,0 \times 10^7$ cellule / cm²) sopra lo strato di fibroblasti. Questo studio ha dimostrato che i due diversi tipi di cellule epiteliali possono

essere stampati direttamente sui siti della ferita e che i costrutti stampati possono imitare la normale pelle murina.

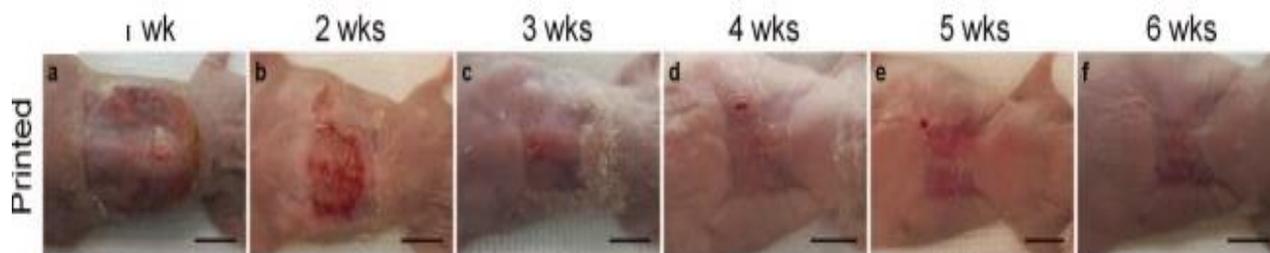


Fig.13: cellule stampate in situ su topo mostrano l'epitelio che si forma sulla ferita già dalla prima settimana, con lo sviluppo della pelle che alla settimana 2 già copre l'intera ferita ma non si è ancora completamente formata. Tra la settimana 4 e la settimana 6, si osserva una contrazione minima e osserviamo un epitelio in fase di maturazione. Barra della scala: 1 cm.

In un altro studio di Lee et. al [35] sono state stampate direttamente cellule staminali derivate da fluidi amniotici (AFSC) su ferite cutanee a spessore totale (2 cm x 2 cm) di topi usando un dispositivo di bioprinting computerizzato a pressione. Gli AFSC e le cellule staminali mesenchimali derivate dal midollo osseo (MSC) sono stati sospesi in gel di fibrina-collagene, miscelati con la soluzione di trombina (un agente reticolante) e quindi stampati sul sito della ferita. La bioprinter è stata utilizzata per depositare due strati di gel di fibrina-collagene depositando uno strato di trombina, uno strato di fibrinogeno/collagene, un secondo strato di trombina, un secondo strato di fibrinogeno/collagene e uno strato finale di trombina. Sebbene gli AFSC esistessero nei siti della ferita solo per un periodo di tempo, la chiusura e la riepitelizzazione della ferita sono state aumentate molto probabilmente dalla secrezione di fattori di crescita da parte delle MSC.

Rimann et al. [36] avevano sviluppato un bioink foto-polimerizzabile pronto per l'uso basato su PEG e usato un metodo di bioprinting basato su microvalvole per fabbricare un modello di tessuto cutaneo multistrato. I modelli cutanei stampati sono stati coltivati e caratterizzati per 7, 14, 21 e 42 giorni. Questo è l'unico studio che riporta la coltura post-stampa per un periodo così lungo. Dopo 42 giorni di coltura del costrutto cutaneo stampato, i cheratinociti epidermici primari umani sono stati seminati manualmente sul costrutto cutaneo. È interessante notare che la formazione dello strato corneo era chiaramente visibile nei modelli cutanei di costrutti coltivati per 6 settimane prima della semina dei cheratinociti mentre non vi era formazione di strati epidermici nei modelli cutanei di costrutti coltivati per meno di 6 settimane. La colorazione di ematossilina ed eosina (H&E) dei modelli di pelle stampata nei giorni 7, 14, 21 e 42 conferma questa osservazione. I fibroblasti nello

strato cutaneo non solo erano vitali e proliferavano fino a 42 giorni, ma producevano anche il loro ECM (collagene I). Questo studio a lungo termine rafforza l'affermazione secondo cui la tecnologia di bioprinting potrebbe essere utilizzata per produrre modelli biomimetici di tessuto cutaneo con ripetibilità e in tempi più brevi (7 minuti per l'intero processo di stampa del costruito cutaneo).

Min et al. [37] hanno creato un tessuto cutaneo pigmentato incorporando melanociti nel processo di stampa. Un giorno dopo la fabbricazione del costruito dermico, melanociti e cheratinociti sono stati quindi stampati in sequenza sul costruito cutaneo. La colorazione H&E del modello di pelle stampata ha mostrato l'evidenza di pigmentazione e granuli di melanina all'interno dello strato epidermico. Oltre agli strati dermico, epidermico e allo strato corneo, sono state osservate pigmentazioni simili a lentiggini alla giunzione dermo-epidermica.

- Bioprinting per estrusione

Cubo et. al [38] hanno creato una pelle a doppio strato a base di plasma umano che è stata applicata con successo per trattare le ustioni e le ferite traumatiche e chirurgiche in un gran numero di pazienti in Spagna. In particolare, hanno usato la tecnica della bioprinting per estrusione per stampare una pelle umana a doppio strato usando bioink contenenti plasma umano, nonché fibroblasti e cheratinociti umani primari ottenuti da biopsie cutanee. Sono riusciti a creare 100 cm² di pelle in meno di 35 minuti (inclusi i 30 minuti richiesti per la gelificazione della fibrina). La pelle generata era molto simile alla pelle umana e, inoltre, era indistinguibile dagli equivalenti dermo-epidermici a doppio strato, realizzati a mano nei loro lavori precedenti in base a quanto viene detto.

In questo studio è stata utilizzata una tecnica di bioprinting 3D FFF (free-form fabrication) solitamente utilizzata per depositare un numero variabile di strati per ingegnerizzare una pelle a doppio strato (ognuno dei quali diviso in 20 sottostrati) derivata dal plasma usando FB e KC ottenuti da biopsie cutanee. La pelle umana stampata è stata analizzata sia in colture 3D in vitro che in vivo dopo l'innesto in topi atimici immunodeficienti usando metodi istologici e immunoistologici. I risultati hanno mostrato che la pelle stampata presentava caratteristiche strutturali e funzionali, nonché aspetto e consistenza simili a quelli della normale pelle umana e ad equivalenti della pelle prodotti manualmente in precedenza dallo stesso gruppo [39]. Lo strato inferiore era una matrice di fibrina derivata dal plasma popolata con FB e lo strato superiore era formato da KC, seminato sulla parte superiore

dell'impalcatura della fibrina. La matrice di fibrina è stata preparata come precedentemente descritto. I bioink per la formazione di sostituti cutanei formati da due strati, che rappresentano il derma (strato inferiore) e l'epidermide (strato superiore), sono stati generati seguendo il metodo sviluppato in [40].

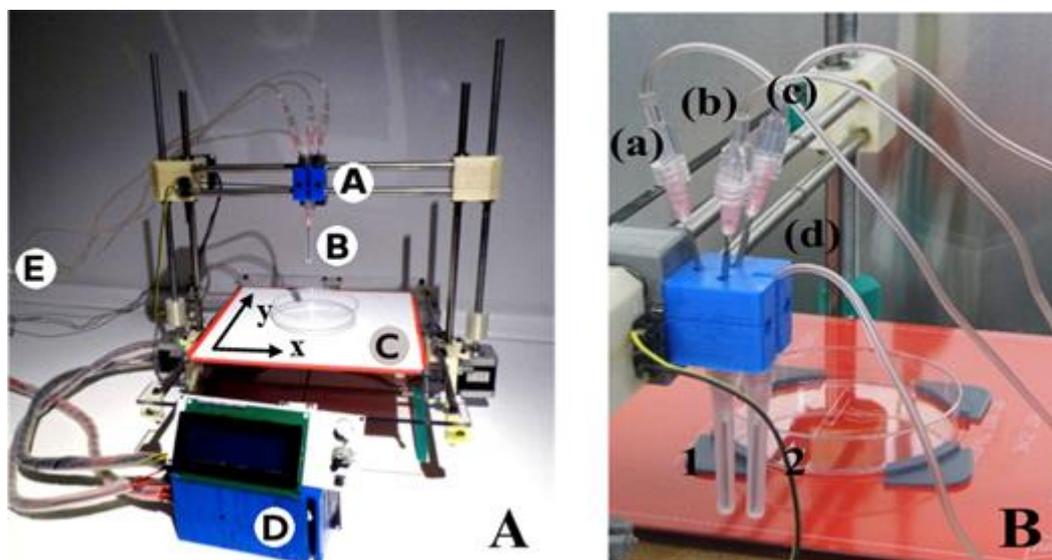


Fig.14: Installazione e componenti della bioprinter. Il plasma umano, gli hFB, il cloruro di calcio (CaCl_2) e gli hKC, rispettivamente, vengono pompate attraverso quattro tubi sterili dal modulo di estrusione E alla testa A. Gli aghi dell'estrusore B depositano i componenti sul piatto di plastica da stampa (P100, Corning 100×20 mm). Il letto riscaldato C mantiene la temperatura a 37°C . Il sistema è controllato dall'unità di controllo D, che è composta da un Arduino con RAMPS 1.4 e interfaccia LCD. (B) Immagine della testa che mostra i tre tubi (a) - (c) che trasportano i componenti del compartimento dermico (hFB, plasma umano e CaCl_2), convergenti al connettore triforcuto che è esso stesso collegato all'ago 1 e al quarto tubo, portando gli hKC, collegati direttamente all'ago 2. Tipicamente, il flusso nell'ago di estrusione era di 12 ml min^{-1} .

Come si può notare, la stampante utilizzata in questo studio utilizza 3 siringhe differenti, caricate di sostanze differenti, per creare il bioink nella cartuccia prima di procedere con la stampa.

7×10^4 hFB in coltura sono stati risospesi in 4 ml di DMEM e caricati nella prima siringa. Nella seconda siringa, un volume di plasma umano contenente 30 mg di fibrinogeno (in genere 13 ml) è stato miscelato con 200 μl di acido tranexamico (agente antifibrinolitico Amchafibrin, Fides-Ecopharma). Infine, in una terza siringa sono stati caricati 2,3 ml di CaCl_2 (preparato all'1% p/v in soluzione salina, (NaCl 0,9% p/v)). La funzione di CaCl_2 è quella di indurre la coagulazione del fibrinogeno plasmatico in un idrogel di fibrina. Il volume totale delle tre siringhe è stato regolato a 25 ml aggiungendo soluzione salina alla terza siringa. Successivamente, le siringhe sono state inserite nel modulo di estrusione della bioprinter e il loro contenuto è stato miscelato. Il processo di stampa è stato progettato per produrre un idrogel di fibrina contenente fibroblasti coperto con un monostrato di KC. Sono stati eseguiti

test in vivo e in vitro per analizzare la vitalità di questi costrutti e la loro capacità di generare una pelle differenziata terminalmente.

Per i saggi in vivo, una volta che i KC erano attaccati alla superficie della fibrina, gli equivalenti coltivati venivano innestati sul dorso di topi immunodeficienti. Quattro topi femmine sono state ferite e hanno subito l'innesto come precedentemente descritto. Sono state prodotte ferite circolari a spessore totale di 12 mm di diametro mediante un punzone sul dorso di ciascun topo. Quindi, campioni circolari dello stesso diametro sono stati ottenuti dallo stesso punzone dai sostituti della pelle stampati, posizionati sulle ferite generate e coperti dalla pelle, precedentemente rimossa da questi topi e devitalizzata, creando in questo modo una tasca sul dorso dei topi. La pelle devitalizzata è stata mantenuta in posizione con l'aiuto di suture. Gli innesti sono stati analizzati otto settimane dopo l'innesto.

Per i test in vitro, i costrutti della pelle depositati sui pozzetti sono stati autorizzati a differenziarsi nell'interfaccia aria-liquido per 17 giorni a 37 ° C in un incubatore di CO2 in mezzo differenziante (terreno KC contenente 0,5% FBS e 50 µm di acido ascorbico). Il supporto veniva cambiato ogni tre giorni.

Tra quattro e sei settimane dopo l'innesto, la pelle di topo devitalizzata, usata come bendaggio biologico, cadde e la pelle umana innestata divenne visibile. Mostrava un aspetto rugoso, spesso e biancastro, molto simile all'aspetto della pelle umana nativa e chiaramente diverso dalla pelle di topo sottile e rosata circostante. L'analisi istologica ha dimostrato che la pelle umana rigenerata presentava una struttura molto simile a quella della normale pelle umana, come si può notare dalla seguente figura.

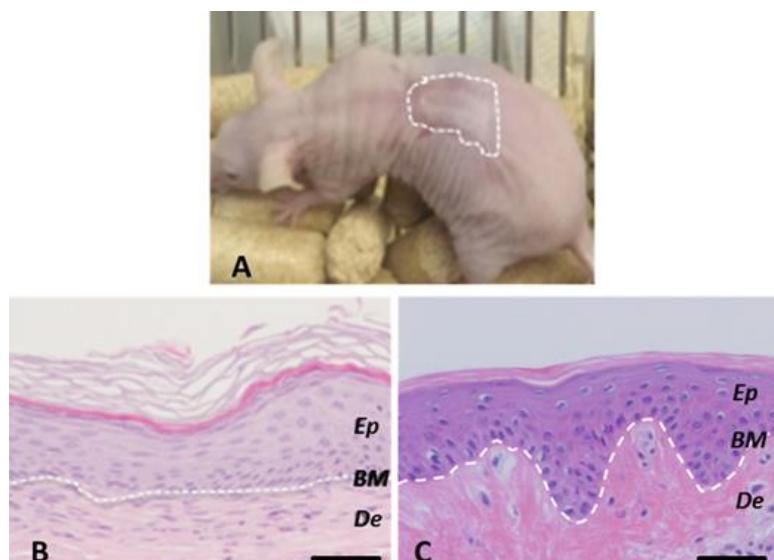


Fig.15: Analisi istologica (8 settimane dopo il trapianto) di pelle umana bioprintata innestata su topi immunodeficienti. (A) Aspetto visivo della pelle umana innestata. La linea tratteggiata segna il confine tra la pelle umana e quella del topo. (B) Colorazione H / E della pelle umana rigenerata. (C) Colorazione H / E della normale pelle umana. La linea tratteggiata bianca in (B) e (C) indica la giunzione dermo-epidermica (membrana basale, BM). Ep e De in (B) e (C) indicano rispettivamente i compartimenti epidermico e dermico. Barra della scala: 100 micron.

Tutti gli strati caratteristici della pelle normale, strato basale, strato spinoso, strato granuloso e strato corneo ben sviluppati sono facilmente identificabili nella pelle stampata. Un'analisi più dettagliata della pelle stampata originale è stata eseguita mediante immunofluorescenza utilizzando marcatori cutanei consolidati. Lo strato basale è stato chiaramente rivelato marcandolo con un anticorpo che riconosce la cheratina K5. La corretta formazione della giunzione dermo-epidermica della pelle è stata confermata dall'etichettatura con un anticorpo che riconosce il collagene umano VII, la proteina che forma le fibrille di ancoraggio che legano l'epidermide e il derma. La presenza della lamina basale e dello strato corneo sono chiare indicazioni di una corretta e completa differenziazione della pelle stampata innestata. Sono state rilevate anche creste di rete (un segno distintivo della pelle umana matura, che non si trova nella pelle del topo) in alcune regioni della pelle stampata innestata. Inoltre, l'immunocolorazione con un anticorpo specifico per la vimentina umana, ha mostrato la persistenza di FB esclusivamente nel compartimento cutaneo della pelle rigenerata. Un altro parametro importante da valutare nel processo di rigenerazione è la vascolarizzazione della pelle umana innestata, che consente l'ossigenazione e la nutrizione del nuovo tessuto e quindi la sua persistenza a lungo termine. I vasi sanguigni sono stati rilevati nel derma della pelle stampata dopo la rigenerazione in vivo.

Pourchet et al. [23] hanno sviluppato un idrogel in gelatina/alginato/fibrinogeno e sospeso normali fibroblasti dermici umani e normali cheratinociti epidermici umani primari per stampare un costrutto di pelle a doppio strato di 5 mm di spessore. Lo strato dermico era completamente popolato di fibroblasti umani ed ECM neosintetizzato e collagene secreti da loro dopo 12 giorni di coltura. Lo strato epidermico del costrutto stampato era stratificato e differenziato. Una struttura della pelle spessa 5 mm è stata stampata in un tempo molto breve (in minuti), a dimostrazione della capacità di questo metodo di bioprinting con idrogel di produrre oggetti su larga scala e complessi. Attraverso la microscopia immunocolorante ed elettronica vengono fornite prove del fatto che la pelle bioprintata presenta tutte le caratteristiche della pelle umana, sia a livello molecolare che macromolecolare. Infine, la stampabilità di oggetti di pelle di grandi dimensioni è stata dimostrata con la stampa di un orecchio di dimensioni adulte.

La formulazione del bio-inchiostro utilizzato aveva tre scopi: (i) mantenere un'adeguata reologia del gel durante il processo di estrusione, (ii) consentire il consolidamento dell'oggetto stampato durante la fase di post-elaborazione e (iii) consentire lo sviluppo adeguato della rete cellulare 3D che porta a una corretta organizzazione e funzione del tessuto maturo.

Queste tre funzioni sono state approvate dai seguenti biomateriali: la gelatina, un polimero a base di collagene con una temperatura di transizione di fase a 35 °C, è stata utilizzata come componente reologico dando al bio-inchiostro la sua forza una volta stampata su un substrato raffreddato ma ancora solubile e quindi eliminata nelle fasi successive del processo. L'alginato, un polimero a base di carboidrati con la capacità di formare idrogel in presenza di calcio, è stato usato come componente strutturale dando stabilità meccanica al bio-inchiostro stampato dopo la solubilizzazione della gelatina. Il fibrinogeno, una glicoproteina con la capacità di formare idrogel, è stato utilizzato sia come componente strutturale che di maturazione grazie alla sua adesione cellulare RGD.

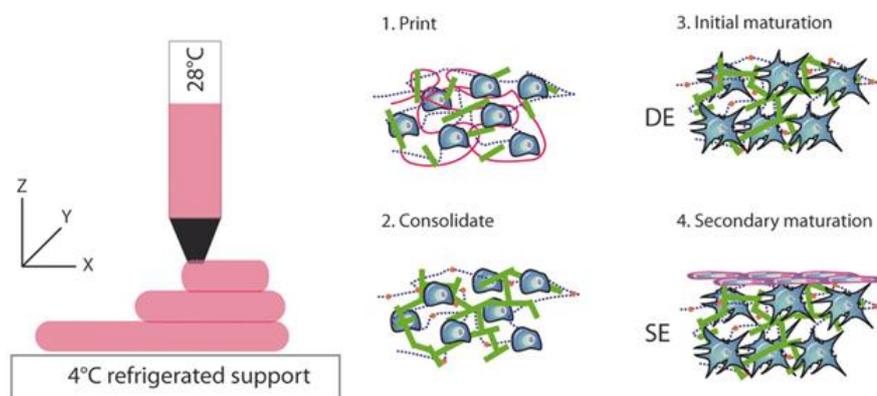


Fig.16: rappresentazione schematica delle fasi di bioprinting, consolidamento e maturazione in 3D usando il bio-inchiostro sviluppato.

Come illustrato nella figura, il processo necessario per il raggiungimento della pelle bioprintata 3D completamente organizzata e funzionale è stato diviso in quattro fasi: il processo di stampa stesso, una fase di maturazione iniziale seguita dal consolidamento in cui è stata rimossa la gelatina mentre l'alginato e il fibrinogeno erano reticolati e la maturazione secondaria durante la quale le cellule stampate erano libere di interagire insieme e con la matrice di fibrinogeno circostante. Questo processo e la formulazione del bio-inchiostro sono stati le chiavi per la stampa di successo di oggetti 3D complessi contenenti cellule viventi di dimensioni nel raggio di centimetro.

Innanzitutto, i risultati della stampa cellulare sono stati raggiunti utilizzando i fibroblasti di topo eGFP NIH 3T3 per la facilità di osservazione e caratterizzazione degli oggetti 3D. Una distribuzione cellulare omogenea è stata ottenuta subito dopo la stampa con una distanza media tra le cellule di $85 \mu\text{m} \pm 25 \mu\text{m}$ e già pochi fibroblasti attaccati caratterizzati dalla loro forma sottile allungata. Dopo solo 7 giorni di coltura, l'oggetto 3D è stato quasi completamente colonizzato dalle cellule con una forte rete cellulare nelle tre direzioni, a dimostrazione della compatibilità sia della tecnica che della formulazione del bioinchiostro con lo sviluppo di una rete di fibroblasti 3D.

L'impatto della sollecitazione da taglio sulla vitalità delle cellule stampate viene generalmente osservata per un valore di sollecitazione superiore a 5000 Pa. Nelle attuali condizioni di configurazione e stampa, sono stati ottenuti valori di sollecitazione da taglio molto bassi, ovvero 11,61 Pa nella parte superiore dell'ugello di stampa e 50,48 Pa nella parte inferiore, con un impatto trascurabile sulla vitalità delle cellule. Questi bassi valori di sollecitazione da taglio sono stati ottenuti grazie innanzitutto a una bassa velocità di stampa ($0,183 \text{ mm}^3/\text{s}$) ma soprattutto alle proprietà reologiche del bio-inchiostro che è in grado di essere molto basso nell'intervallo della velocità di stampa a 28 °C.

Sulla base di questi eccellenti risultati, sono stati stampati oggetti di $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm} \times 0,5 \text{ cm}$ ($p \times l \times h$) composti da fibroblasti cutanei umani normali ottenuti da donatori sani anonimi. Gli oggetti stampati sono stati coltivati, portando al derma bioprintato (BPD) e quindi seminati con normali cheratinociti epidermici umani primari da giovani donatori al fine di generare una pelle bioprintata completamente organizzata e funzionale (BPS). La colorazione live/dead del derma appena stampato è stata eseguita per valutare la vitalità delle cellule primarie umane stampate. Non è stato possibile osservare alcuna tossicità cellulare dopo l'estrusione del bio-inchiostro attraverso l'ugello della stampante ($200 \mu\text{m}$), confermando ancora una volta il basso impatto di sollecitazione da taglio sulla vitalità delle cellule stampate.

L'analisi immunohistologica della pelle bioprintata ha anche mostrato l'espressione del numero di proteine che si trovano tipicamente nella matrice extracellulare. Il collagene I e V, la vimentina, la fibrillina e l'elastina sono stati espressi abbondantemente, indicando la complessa ricostruzione e rimodellamento della pelle stampata bioprintata.

Come studio finale e al fine di introdurre la capacità della tecnica di produrre oggetti su larga scala e complessi, è stato stampato un orecchio umano di dimensioni adulte (8 cm). Il bio-ink è quello descritto in precedenza e per la preparazione di BPD, normali fibroblasti dermici umani sono stati aggiunti a tale bioink per le stampa. Questi FB sono stati coltivati per 12 giorni ad una temperatura di 37 °C in una atmosfera al 5% di CO₂. Come si può vedere nella figura successiva, la complessa architettura dell'orecchio è stata facilmente ottenuta e ha conservato l'organizzazione 3D durante la coltura (vale a dire, l'immersione nel mezzo di coltura DMEM (Dified Eagle Medium) di Dulbecco). Inoltre, la caratterizzazione istologica e morfologica del tessuto stampato era identica ai risultati osservati nel costrutto sopra descritto, a dimostrazione della riuscita stampa dei complessi oggetti 3D del derma.

L'unico approccio tradizionale disponibile in grado di produrre un derma spesso 5 mm con tale differenziazione e qualità dermica è la spugna di collagene sulla quale vengono seminate le cellule. Questo approccio è qualitativamente equivalente ma richiede tempi di maturazione più lunghi e non consente forme di produzione complesse.

In conclusione, posizionando con precisione i materiali biologici e biochimici e le cellule viventi con controllo spaziale, l'approccio alla bioprinting 3D offre vantaggi significativi rispetto ai moderni metodi di ingegneria del tessuto cutaneo. Il modello qui presentato può essere ulteriormente esteso incorporando altri tipi di cellule della pelle come cellule endoteliali, adipociti e melanociti, al fine di ricapitolare funzioni cutanee più complesse all'interno del modello cutaneo bioprintato.

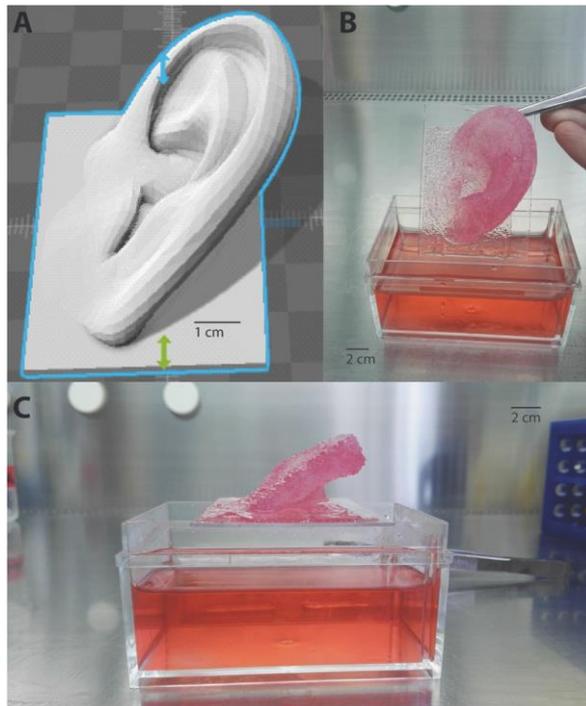


Fig.17: Stampa 3D di un costrutto cutaneo complesso. A) File 3D utilizzato per la stampa dell'orecchio umano. B, C) Un orecchio adulto stampato (8 cm) composto da bio-inchiostro descritto e fibroblasti umani.

Huang et al. [41] hanno valutato il potenziale del metodo di bioprinting per estrusione per fabbricare costrutti cutanei 3D che faciliterebbero la differenziazione diretta dei progenitori epiteliali per la rigenerazione delle ghiandole sudoripare. I risultati in vivo, che coinvolgono la deposizione diretta della pelle stampata in zampe bruciate di topi, hanno dimostrato il ripristino funzionale delle ghiandole sudoripare (dopo 14 giorni valutati con test del sudore di iodio/amido).

4 POST-PROCESSING

La post-elaborazione del costrutto cutaneo stampato è un passaggio essenziale nella produzione di pelli biomimetiche perfettamente funzionanti. Consente la proliferazione dei fibroblasti dermici e dei cheratinociti epidermici e la differenziazione dei cheratinociti, ed influenza sostanzialmente le proprietà strutturali e meccaniche dei tessuti cutanei stampati. In vitro, la coltura tissutale è necessaria per indurre la proliferazione e la differenziazione cellulare affinché il tessuto cutaneo sia biologicamente funzionale [3]. Il metodo di coltura più comune in questi casi è la coltura statica di strutture stampate all'Air-Liquid Interface (ALI) [8]. La coltura ALI promuove la differenziazione terminale dei cheratinociti e la formazione di corneociti e strato corneo, imitando la struttura stratificata della pelle reale. Sebbene il metodo post-costruzione convenzionale offra un modo conveniente per far crescere cellule e tessuti in vitro, non è adatto per una produzione efficiente di tessuti di grandi dimensioni a causa delle limitazioni del trasferimento di massa e del lungo periodo di coltura richiesto. Il trasferimento di massa di nutrienti e gas potrebbe operare solo tramite diffusione nelle colture convenzionali, che è efficace solo in uno strato spesso ~100-200 μm a contatto con il terreno di coltura. Pertanto i bioreattori, che possono indurre il trasferimento di massa convettivo mediante agitazione o rotazione meccanica, potrebbero essere un'opzione più efficace per la coltura di costrutti di tessuto stampato che sono almeno su una scala di lunghezza di millimetri. Inoltre, gli studi hanno dimostrato che le forze meccaniche, comprese la compressione, la tensione e la forza di taglio, generate nei bioreattori potrebbero modulare la bioattività delle cellule e quindi accelerare la crescita dei tessuti quando le cellule rispondono a questi segnali meccanici [6].

5 VALUTAZIONE DEL PRODOTTO

Esistono numerosi indicatori chiave per valutare un costrutto cutaneo come un notevole sostituto biomimetico della pelle, anche prima di dimostrare che si tratta di un modello robusto per una determinata applicazione. Tali indicatori dovrebbero, come minimo, dimostrare la vitalità delle cellule cutanee stampate e la produzione di matrice extracellulare (ECM). È ben documentato che l'omeostasi tissutale è mediata da segnali epiteliali-mesenchimali diffusi e che un'organizzazione e una composizione della membrana basale ben strutturata (BM) sono essenziali per l'integrità della pelle. Infine, la corretta stratificazione, la localizzazione dei marker di differenziazione epidermica e le caratteristiche di barriera molecolare e funzionale del costrutto cutaneo sono importanti indicatori del normale comportamento epidermico. Il compartimento cutaneo è ricostruito al meglio inserendo fibroblasti in un biomateriale. Il biomateriale, come discusso nelle sezioni precedenti, dovrebbe essere stabile e ondulato in modo tale da fornire tensione intrinseca per stimolare i fibroblasti a sintetizzare e creare ECM nativa. Per raggiungere questo obiettivo, i fibroblasti dovrebbero rimanere vitali per un certo periodo di tempo e la loro vitalità e distribuzione dovrebbero essere stabili per la durata della vita del costrutto. Attraverso l'istologia e l'immuno-colorazione delle sezioni trasversali dei tessuti si possono ricavare informazioni fondamentali riguardo alle caratteristiche interne del costrutto stampato e alle condizioni di crescita e sviluppo e differenziazione cellulare. L'immuno-colorazione con vimentina, darà un'idea di morfologia e di vitalità all'interno dell'idrogel. Inoltre, la colorazione vivo-morto può non solo fornire una misura quantitativa della vitalità, ma anche una rappresentazione visiva della distribuzione dei fibroblasti all'interno del costrutto cutaneo. La valutazione quantitativa dei componenti dell'ECM nel derma è fondamentale per valutare la qualità del derma, prima dell'aggiunta dei cheratinociti nella parte superiore. La produzione di ECM nativa dovrebbe iniziare poco dopo l'incubazione della coltura e la produzione dovrebbe continuare ad aumentare con la nuova ECM depositata nel tempo. Ancora una volta l'immuno-colorazione delle sezioni trasversali dei tessuti dovrebbe mostrare fibronectina iniziale e colorazione positiva di tenascin. Queste proteine stimolano la produzione di matrice provvisoria, seguita da un costante aumento dei collagene nativi di un derma maturo, principalmente collagene di tipo I e III con il tempo. È interessante notare che è stato anche dimostrato che la presenza di cheratinociti aumenta significativamente la produzione di ECM da parte dei fibroblasti e che i cheratinociti sono essenziali per l'induzione di fibre elastiche in equivalenti cutanei. L'uso dell'immunofluorescenza, un'analisi approfondita dei singoli modelli di espressione della cheratina nel tempo, può fornire solide

prove che un costrutto è funzionale e simile alla normale pelle umana. Le proteine giunzionali coinvolte nell'adesione cellula-cellula come la E-caderina e i componenti desmosomali desmocollin-1 dovrebbero essere espresse negli strati soprabasali.

5.1 FUNZIONALITA' MECCANICHE

Oltre all'aspetto biologico, un altro fattore importante da considerare nel determinare un buon e riuscito costrutto della pelle artificiale è la sua biomeccanica o proprietà meccaniche. Soprattutto per i tessuti molli come la pelle, avere proprietà meccaniche adeguate è cruciale per una corretta funzionalità. La pelle umana presenta proprietà viscoelastiche (comportamento elastico non lineare) ovvero presenta caratteristiche sia viscosi (dissipazione di energia) sia elastiche (conservazione di energia) durante la deformazione [6] [3] [8] [10] [11]. Tali proprietà sono principalmente apportate dallo strato cutaneo della pelle, che contiene collagene ed elastina come componenti strutturali primari. Le fibre di collagene forniscono l'impalcatura e la resistenza, mentre le fibre di elastina formano legami covalenti con fibre di collagene per dare l'elasticità e la resilienza, che consentono alla pelle umana di subire una deformazione ampia ma reversibile. Un'altra importante proprietà della pelle è la sua anisotropia [6] [3] [8] [10] [11], il che significa che le proprietà meccaniche della pelle variano quando misurate lungo direzioni diverse, correlate all'orientamento delle fibre di collagene. Diversi studi hanno riportato che il modulo elastico di Young del derma umano asportato varia da 0,1 kPa a centinaia di Mpa [3], a seconda di molti fattori come i metodi di valutazione usati per ricavare questo parametro, il sesso, la fascia di età, le aree del corpo. Con tutti questi fattori che entrano in gioco, diventa più complesso fabbricare un costrutto cutaneo avente precise proprietà meccaniche rispetto alla normale pelle umana.

Un potenziale approccio alternativo al lavoro sperimentale è la modellazione al computer. Utilizzando strumenti di modellazione e simulazione adeguati, i ricercatori hanno potuto tentare di includere il maggior numero possibile di parametri per sviluppare modelli computazionali più realistici e accurati (o perfezionare quelli attuali) per aiutare a prevedere le proprietà meccaniche (e anche biochimiche) del costrutto cutaneo. In termini di proprietà meccaniche di un costrutto stampato della pelle, la maggior parte degli attuali lavori di ricerca sperimentale si concentra sull'aumento della stabilità meccanica del costrutto a causa della mancanza di resistenza e delle proprietà viscoelastiche di un bio-inchiostro o di un idrogel [6] [8] [5]. Tutti questi fattori e parametri devono essere attentamente considerati nella scelta del polimero sintetico per migliorare le proprietà meccaniche di un costrutto di

pele stampata. Ciò pone anche alcune altre domande difficili ai ricercatori che vale la pena affrontare, come ad esempio quando è il momento giusto (ad esempio quando stampato di fresco, durante/dopo la popolazione cellulare, nel corso del degrado del materiale, ecc.) per misurare le proprietà del costrutto stampato dato il suo comportamento dinamico e dipendente dal tempo. Ad esempio, è stato riportato [3] che la resistenza alla trazione e la rigidità finali inizialmente migliorate di un sostituto cutaneo (collagene con aggiunta di glicosaminoglicani e reticolanti) sono diminuite significativamente dopo 6 giorni di coltura di fibroblasti. Oltre alla fusione con polimeri sintetici, alcuni altri studi impiegano la reticolazione per aumentare la resistenza e la rigidità (e la fragilità in alcuni casi), come la reticolazione del collagene-glicosaminoglicano con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimide (EDC) ma con una certa tossicità rilevata a una concentrazione di EDC superiore a 5 mM. Il fotoincrocio è un altro approccio simile, in cui le proprietà meccaniche (governate dalla densità del reticolato) dell'idrogel possono essere migliorate con il fotoinziatore, l'intensità della luce e il tempo di esposizione appropriati, sebbene sussista il rischio di danni alle cellule. Anche la progettazione architettonica di un costrutto cutaneo è fondamentale per garantire proprietà meccaniche favorevoli, soprattutto perché lo scaffold e la struttura forniscano la struttura portante e il supporto all'intero costrutto. Diversi modi di organizzare e modellare le reti o i frame di polimeri sintetici fanno la differenza nella resistenza alla forza. È stato dimostrato che uno scaffold con PCL avente una distribuzione uniforme di questo biomateriale all'interno della struttura e non solo un accumulo laterale di protezione mostrava una struttura più stabile. Allo stesso modo, la spaziatura, l'orientamento e lo spessore delle fibre PCL possono anche essere personalizzabili per regolare le proprietà meccaniche [42]. Ancora più interessante, è stato anche riferito che con una progettazione e una stampa adeguate, è possibile avere un modello solo in collagene che non si restringe [9]. Questo fenomeno può essere dovuto alla gelificazione uniforme del collagene quando stampato strato per strato (reticolato con vapore disperso NaHCO_3) e una matrice di collagene uniformemente gelificata può facilitare la dispersione uniforme delle forze contrattili dei fibroblasti, minimizzando così la contrazione e la deformazione dei tessuti. Infine, anche un adeguato post-trattamento e un condizionamento meccanico dei costrutti della pelle stampati potrebbero rappresentare un potenziale approccio per raggiungere proprietà meccaniche più vicine alla normale pelle umana [6] [5]. Esempi di condizionamento meccanico includono stiramento periodico, pulsazione o compressione del costrutto stampato, che simula le forze fisiche effettive che un tessuto o organo sperimenta in vivo. Sotto l'influenza di queste forze, non solo è possibile migliorare

la resistenza e la flessibilità del costrutto, ma anche la riorganizzazione della matrice e la maturazione del costrutto possono essere aumentate o accelerate. Ad esempio, è noto che il flusso pulsante attraverso un costrutto simile a un capillare migliora la produzione di collagene all'interno della parete capillare, aumentando così la sua rigidità [24]. In generale, la post-elaborazione e il condizionamento possono essere eseguiti selezionando il tipo appropriato di bioreattore per simulare una forza desiderata adatta alla maturazione di un particolare tipo di costrutto tissutale [3]. La semplice variazione del contenuto di cellulosa può anche dare proprietà meccaniche diverse che assomigliano a diversi tipi di pelle. Mentre la biomeccanica di questo materiale ingegnerizzato e il modello concettuale sono promettenti, l'idoneità e la biocompatibilità di questo materiale per la crescita delle cellule dei fibroblasti rimane una domanda. Nel complesso, è interessante notare che oltre alla regolazione delle proprietà meccaniche, un approccio di condizionamento può anche aiutare a migliorare le funzioni di un costrutto di tessuto, che può essere importante soprattutto per i costrutti che verranno impiantati in vivo poiché devono integrarsi con il tessuto circostante e funzionare correttamente. Sebbene questa sia una strategia interessante, occorre anche considerare se le forze meccaniche comporteranno un impatto negativo significativo sulle cellule, che può essere affrontato ottimizzando l'entità delle forze utilizzate. In conclusione, le proprietà meccaniche di un buon costrutto cutaneo dovrebbero avere criteri corrispondenti o almeno simili a quelli della normale pelle umana, in particolare la viscoelasticità. Tale proprietà manca nella maggior parte degli attuali idrogel (principalmente polimeri naturali) utilizzati. Tuttavia, è interessante notare che questa proprietà può essere più cruciale nel caso dell'uso di costrutti della pelle per terapie, ma non necessariamente fondamentale quando viene utilizzata come strumento di ricerca per studi in vitro.

5.2 IMPLICAZIONI IN COSMETOLOGIA, STUDI DI FARMACI E IMPIANTI

I modelli di pelle bioprintata in 3D di successo possono essere utilizzati come modelli in vitro per lo sviluppo farmaceutico, per i test dei sistemi di rilascio dei farmaci e per lo screening dei farmaci. I comportamenti di un composto sulla pelle includono permeazione/assorbimento, metabolismo e azione, che dipendono dal metodo di applicazione. Oltre alla standardizzazione del prodotto e all'approvazione normativa, i prodotti stampati in 3D devono anche dimostrare un comportamento simile alla normale pelle umana. Ad esempio, per gli studi sulla penetrazione dei farmaci è necessaria la funzione di barriera cutanea. Oltre allo screening e allo sviluppo di farmaci, un modello di

pelle artificiale ben progettato può essere utilizzato per la valutazione in vitro di nuovi sistemi transdermici di rilascio di farmaci e vaccini oltre che per il test in vitro di nuovi cosmetici, evitando così di dover ricorrere alla pelle animale per tali esperimenti [3].

6 PROSPETTIVE FUTURE

6.1 STAMPE CON VASI SANGUIGNI

La formazione di capillari robusti, altamente ramificati e interconnessi che imitano la vascolarizzazione in vivo è un fattore cruciale per lo sviluppo di successo di un costrutto cutaneo ingegnerizzato completamente funzionale. Per sviluppare un tessuto cutaneo funzionale utilizzando la bioprinting 3D, è necessario consentire non solo la formazione di costrutti vascolarizzati, ma anche il loro collegamento in rete mediante anastomosi con vascolarizzazione dell'innesto.

Un recente studio di Zhao et. al [43] ha esplorato la fabbricazione di complessi costrutti cutanei vascolarizzati, costituiti da una struttura dura circondata da una matrice organica morbida. La bioprinting è stata eseguita utilizzando una doppia piattaforma di bioprinting 3D composta da una bioprinter 3D FDM e una bioprinter 3D SLA, utilizzando la deposizione alternata di fibre di polilattide biodegradabile (PLA) e idrogel di gelatina caricata con cellule di gel di metacrilato (GelMA). Fattori bioattivi come BMP2 e VEGF sono stati incorporati nel costrutto per promuovere contemporaneamente la proliferazione e l'angiogenesi nel costrutto.

Nel bioprinting cutaneo, per migliorare l'angiogenesi, è stato sviluppato e testato uno scaffold composito di seta di gelatina solfonato che è stato incorporato con il fattore di crescita base dei fibroblasti 2 (FGF-2) da Xiong et al. 2017 [44] che hanno dimostrato che le impalcature di fibroina di seta a base di gelatina stampate in 3D hanno promosso la guarigione di difetti cutanei a tutto spessore e che l'incorporazione di FGF-2 potrebbe migliorare ulteriormente l'efficacia del trattamento. È stato dimostrato che il fattore di crescita incorporato FGF-2 presentava una cinetica a rilascio prolungato ed era in grado di stimolare la proliferazione cellulare e la migrazione in vitro. Successivamente, l'impalcatura stampata in 3D ha mostrato risultati promettenti quando utilizzata per il trattamento di lesioni cutanee a tutto spessore in un modello di ratto. L'incorporazione di FGF-2 all'interno dell'impalcatura ha migliorato il tasso di proliferazione (da ~ 40% a ~ 75%), la morfologia dei tessuti, l'assemblaggio di fibrille di collagene, la formazione di vasi sanguigni e l'espressione di vari marcatori corrispondenti. Questi dati suggeriscono quindi che l'FGF-2 ricombinante fornito dall'impalcatura stampata in 3D potrebbe essere una strategia terapeutica praticabile e innovativa per gravi difetti della pelle.

Prove di studi precedenti suggerivano che le impalcature in composito di seta mostrano un'efficacia positiva nella rigenerazione della pelle a tutto spessore e nella guarigione delle ferite dopo incorporazione con specifici fattori di crescita e cellule. Sebbene dimostrato di essere benefico, il tasso di degradazione relativamente lento dei ponteggi in composito di seta è incompatibile con i tessuti rigeneranti, riducendo così la sua efficacia.

L'angiogenesi e la neovascolarizzazione sono fondamentali per la guarigione delle ferite cutanee, poiché i vasi sanguigni di nuova formazione forniscono nutrimento e ossigeno ai tessuti in crescita⁷. L'FGF-2 ha dimostrato di stimolare la maturazione dei vasi sanguigni. Nel modello di riparazione delle ferite cutanee in vivo utilizzato in questo studio, l'immunoistochimica ha mostrato un'espressione significativamente aumentata delle proteine correlate ai vasi sanguigni come α -SMA e CD31. L'analisi della cinetica di rilascio di FGF-2 ha mostrato un rilascio continuo di FGF-2 dallo scaffold di seta solfonato, a causa del suo legame con la fibra di seta solfonata che imita le interazioni naturali tra FGF-2 e il glicosaminoglicano solfato nell'ECM. Pertanto, il rilascio continuo di FGF-2 dallo scaffold ha contribuito all'aumentata espressione delle proteine correlate ai vasi sanguigni nel modello di ratto.

Al momento, le tecniche per incorporare i fattori di crescita all'interno dei biomateriali si concentrano principalmente su due strategie, la miscelazione diretta e il legame chimico covalente. Le principali carenze della miscelazione diretta sono la bassa efficienza di caricamento e il rilascio inadeguato del fattore di crescita. D'altra parte, il legame covalente è associato a un duro trattamento chimico che compromette la bioattività dei fattori di crescita. E' stata utilizzata questa interazione non covalente tra derivati SF e FGF-2 per ottenere un sistema a rilascio lento. Inoltre, l'aggiunta di frazioni solfonate a SF può aumentare gradualmente l'idrofilia di SF, il che potrebbe comportare una maggiore adesione cellulare e una maggiore bioattività su una superficie biomateriale più idrofila. Questo potrebbe essere il motivo del miglioramento osservato dell'adesione cellulare nel nostro studio.

La fabbricazione del ponteggio 3DG-SF-SO₃ comprendeva tre fasi. Inizialmente, la gelatina in polvere veniva sterilizzata mediante radiazione UV e sciolta in acqua distillata ad una concentrazione del 2% (p/v). Una griglia di gelatina di 2 cm * 2 cm (la rete di base dell'impalcatura) è stata prodotta da un sistema di bio-stampa pneumatica con un ugello a siringa da 100 μ m e una velocità di stampa di 5 mm/s all'interno di un armadio a flusso

laminare. Dopo la stampa, i ponteggi sono stati reticolati con una soluzione EDC-NHS all'1% (m/v) per 2 ore. Quindi, il derivato solfonato di fibroina di seta è stato versato sugli scaffold stampati in 3D, seguito da conservazione temporanea a 4 °C per 4 ore e successivo congelamento (-80°C) per 12 ore. Infine, l'impalcatura è stata imbevuta di soluzione FGF-2 (100 µg/ml) durante la notte per assorbire il fattore di crescita, seguita da conservazione dopo sterilizzazione mediante irradiazione gamma. L'intensità utilizzata per la sterilizzazione è di 20 ~ 25 KGy. Poiché lo spessore dell'epidermide e dello strato del derma è teoricamente ritenuto compreso tra 1 e 10 mm a seconda della parte specifica del corpo, si è scelto di stampare le impalcature di gelatina che imitano lo spessore della pelle entro l'intervallo normale.

Sulla schiena del ratto è stato generato un difetto a tutto spessore di 20 mm * 20 mm.

Al fine di valutare gli effetti degli scaffold stampati in 3D sulla riparazione della pelle, entrambi gli scaffold 3DG-SF-SO₃-FGF e gli scaffold 3DG-SF-SO₃ sono stati trapiantati su un difetto cutaneo a tutto spessore sulla superficie dorsale del ratto. Al fine di osservare la guarigione delle ferite e la vascolarizzazione, i tessuti appena formati dalla pelle dorsale del ratto sono stati analizzati dopo 14 e 28 giorni dopo l'intervento. I risultati hanno mostrato che l'impalcatura 3DG-SF-SO₃-FGF ha contribuito a levigare le ferite dopo l'intervento chirurgico e sono stati visibili più vasi sanguigni nel gruppo 3DG-SF-SO₃-FGF, come mostrato nella figura 19.

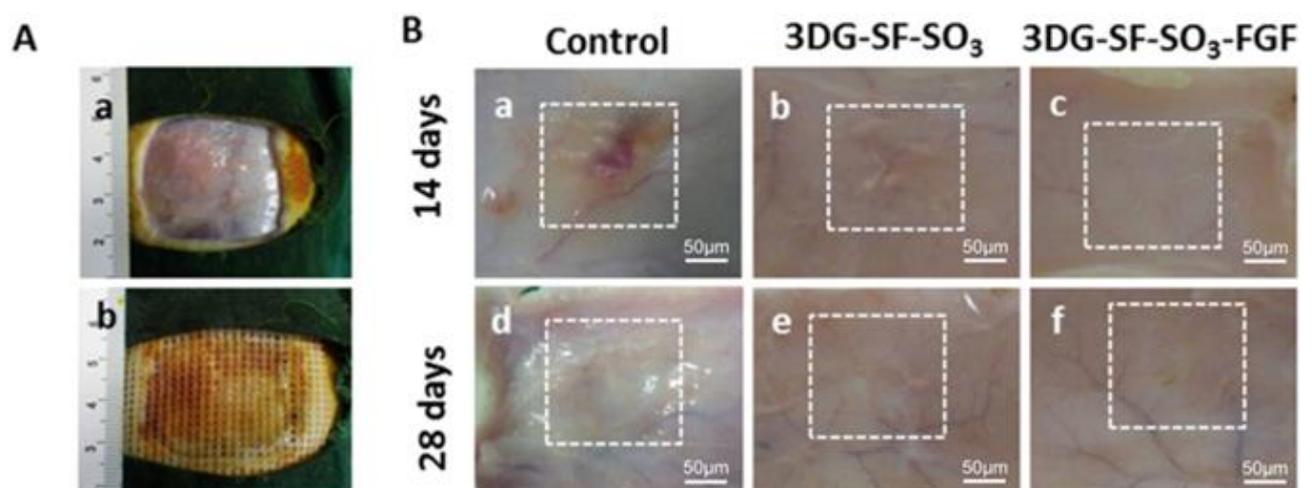


Fig.19: (A) Micrografie di chirurgia animale (a, b). (B) Osservazione grossolana dell'angiogenesi nei tessuti di nuova formazione delle ferite cicatrizzanti al giorno 14 e al giorno 28 post-operatorio. Barre di scala, 50 micron.

La colorazione istologica è stata anche impiegata per valutare la guarigione delle ferite su campioni raccolti il giorno 14 e il giorno 28 post-impianto. All'interno delle immagini

ingrandite, è possibile rilevare piccoli vasi e globuli rossi freschi nello strato dermico dei gruppi 3DG-SF-SO₃ e 3DG-SF-SO₃-FGF. La rivascularizzazione è stata osservata come più ampiamente distribuita nel gruppo di scaffold in cui è stato incorporato FGF-2.

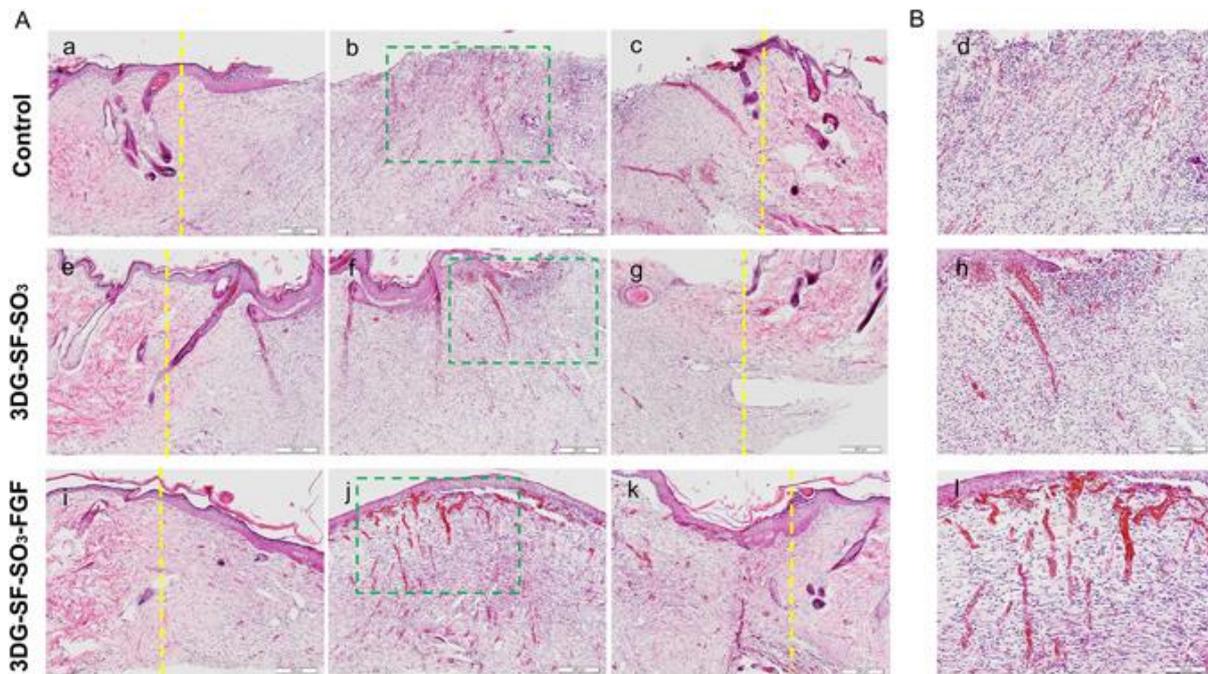


Fig.20: Colorazione rappresentativa H&E delle sezioni di tessuto cutaneo dopo 14 giorni dall'intervento. che illustrano il processo di guarigione a sinistra (a, e, i), al centro (b, f, j) e a destra della ferita (c, g, k). Le linee gialle nelle immagini indicavano i confini tra la ferita e la cute normale circostante. (B) Vista ingrandita (d, h, l) delle regioni nel riquadro verde nella figura (A) (b, f e j). Barre di scala = 200 μm (A) e 100 μm (B) rispettivamente.

Confrontando la formazione dei vasi sanguigni, è stato osservato che il numero di nuovi vasi sanguigni mostrati il giorno 28 è diminuito drasticamente rispetto al giorno 14 e si è notata una morfologia dei vasi sanguigni più normale.

6.2 STAMPE CON GHIANDOLE SUDORIPARE

Già da molto tempo le cellule primarie sono state utilizzate per costruire modelli di pelle sana e patologica. Uno dei principali problemi con l'utilizzo di cellule epiteliali primarie è che hanno un numero limitato di evoluzioni di popolazione e subiscono senescenza.

Ad oggi esistono in commercio diversi tipi di pelle messi a disposizione dalle industrie [8]. Come visto, il modello di pelle 3D più semplice disponibile è un'epidermide pigmentata ricostruita in vitro da cheratinociti. Questo modello rappresenta la funzione di barriera dello strato corneo e viene utilizzato per la valutazione del rischio in campo farmacologico e cosmetico. Un modello di pelle in vitro leggermente più complesso consiste in un'epidermide ricostruita su un derma popolato di fibroblasti. Accanto alla funzione di barriera dello strato

corneo vi è in una certa misura un dialogo incrociato tra cheratinociti e fibroblasti. Tuttavia, ad oggi, questi modelli di pelle disponibili in commercio non contengono cellule endoteliali, cellule immunitarie, tessuto adiposo o appendici cutanee e le proprietà di barriera sono ridotte rispetto alla pelle umana in vivo. Pertanto hanno una limitata rilevanza fisiologica per la valutazione del rischio di impianto e di test dei nuovi farmaci. Accanto ai fibroblasti, le cellule endoteliali sono state aggiunte al compartimento cutaneo di un modello di pelle dove formano strutture simili a vasi [45]. Tuttavia, questi modelli di pelle mancano di un sistema vascolare perfuso funzionale, limitando le applicazioni cliniche e di ricerca. Un terzo strato di pelle contenente adipociti (tessuto adiposo) è stato aggiunto ai modelli di pelle a tutto spessore [46]. Questi modelli di pelle con un ipoderma contenente adipociti hanno mostrato una migliore differenziazione epidermica ed espressione delle proteine della membrana basale rispetto ai modelli di pelle a due strati. Questo modello può essere utile per introdurre i follicoli piliferi, che si trovano in parte nel tessuto adiposo. È stata anche descritta un equivalente cutaneo riproducibile con cellule immunitarie integrate funzionali (cellule di Langerhans) [47]. Le cellule di Langerhans sono in grado di avviare una risposta immunitaria innata in caso di allergia o esposizione irritante in modo simile alla cute nativa. La fase successiva nello sviluppo di questo modello sarebbe quella di introdurre le cellule T al fine di studiare le risposte immunitarie adattive, come il priming e la sensibilizzazione delle cellule T.

Groeber et. al [48] hanno descritto il primo modello di pelle a tutto spessore in vitro con una rete vascolare perfusa utilizzando l'approccio classico manuale. La bioprinting 3D, come ampiamente discusso, è la tecnica maggiormente all'avanguardia nel campo della rigenerazione tissutale ed ha permesso di raggiungere i notevoli risultati precedentemente mostrati. Inoltre è possibile aggiungere maggiore complessità stampando la struttura vascolare o un ambiente controllato per cellule di nicchia (ad es. follicolo pilifero, ghiandole sudoripare).

Ad esempio Lui et al. [49] hanno mostrato una matrice stampata in 3D come nicchia restrittiva per la differenziazione diretta delle ghiandole sudoripare dai progenitori epidermici (PE) tramite morfogenesi ghiandolare in vitro.

L'influenza di parametri fisici come la dimensione dei pori e la geometria è di crescente interesse nel campo delle tecniche di stampa 3D, ma il loro ruolo nell'organizzazione delle cellule da tessuto ghiandolare era ancora inesplorato. In questo studio, la struttura porosa

3D è un punto chiave per promuovere la crescita ghiandolare fornendo spazio adeguato per l'aggregazione cellulare. Inoltre, con la stampa cellulare, l'idrogel a base di gelatina consente di produrre una nicchia induttiva con componenti ECM definiti e l'opportunità di introdurre porosità predefinita per la ricostruzione delle ghiandole sudoripare nei costrutti 3D.

Tramite la stampa diretta con il sistema di bioprinting pneumatico 3D, sono stati creati 2 tipi di bioink carichi di cellule (con e senza fattore di crescita PD) miscelati in 2 ugelli di stampa differenti (300 e 400 μm). In breve, cellule e PD sono state incorporate in idrogel usando una soluzione disciolta per ipertermia da 48 ml di 0,2 g/ml di gelatina miscelata con una soluzione da 24 ml che includeva 0,04 g/ml di alginato di sodio a 25 ° C.

Con il processo di stampa strato per strato, blocchi incrociati e pori quadrati sono stati determinati come 2 architetture tipiche. I costrutti stampati a 300 μm producevano una larghezza dei pori maggiore rispetto ai costrutti stampati a 400 μm ($1,4\pm 0,1$ vs $1,1\pm 0,1$ mm), ma la larghezza del blocco era inferiore ($0,6\pm 0,1$ vs $1,1\pm 0,1$ mm). Quattro costrutti porosi rappresentativi ($20 \times 20 \times 5$ mm) hanno mantenuto la stabilità strutturale e le cellule sono state omogeneamente incorporate dopo una coltura di 24 ore.

Gli EP mantengono sistematicamente i principali marker epidermici K5 e K14 (che rappresentano le chinasi primarie di creatina di epitelio stratificato). Una volta che le cellule si differenziano in cellule delle ghiandole sudoripare, dovrebbero perdere i marcatori epiteliali originali e ottenere marcatori epiteliali luminali (ad es. K18, CK19). Pertanto, è stata utilizzata la conversione dell'espressione del marker come indicatore di differenziazione. In particolare, gli EP nel costrutto 300 μm e PD hanno mostrato una forte espressione di K18 e K19 rispetto ad altri costrutti al giorno 5. Dopo la coltura iniziale di 14 giorni, nel costrutto 300 μm e PD è stata ottenuta una conversione più evidente dell'espressione del marker.

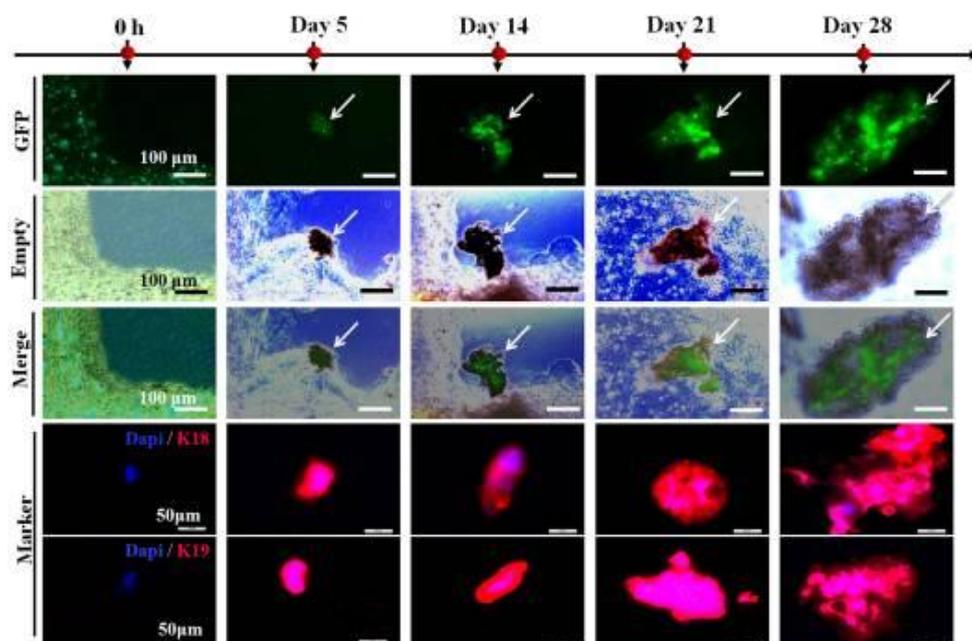


Fig.21: L'avanzamento della morfogenesi delle ghiandole sudoripare in campioni casuali di costrutto stampato 300 μm e PD +. (barra di scala: 100 μm per immagini a fluorescenza; 50 μm per immagini a immunofluorescenza).

La morfologia del tessuto delle ghiandole sudoripare è stata rilevata solo nel costrutto 300 μm e PD dopo il giorno 28 di coltura. Al contrario, le cellule differenziate nei costrutti stampati a 400 μm (indipendentemente dalla presenza di PD) e nei costrutti stampati a 300 μm (senza PD) sono risultate molto ridotte. I costrutti stampati a 300 μm hanno conferito un aumento significativo degli aggregati delle cellule delle ghiandole sudoripare dalle settimane 1 a 2 e il germoglio della ghiandola sudoripara emerso alla settimana 3. Tuttavia, una volta privato del supporto architettonico 3D, il processo formativo auto-organizzato è stato gradualmente interrotto.

Questi risultati rivelano il ruolo precedentemente sconosciuto del controllo spaziale della struttura stampata in 3D sul comportamento differenziato delle cellule negli stadi di sviluppo del tessuto ghiandolare. Questi risultati potrebbero approfondire significativamente la comprensione della tecnologia di bioprinting 3D.

Le tecniche convenzionali utilizzate per fabbricare scaffold mancano del pieno controllo della morfologia e dell'architettura dei pori e della loro riproducibilità. In questo studio, la strategia di stampa ha controllato i parametri di stampa e raggiunto un'elevata vitalità delle cellule. Un altro ruolo importante della stampa 3D è orientare la differenziazione delle ghiandole sudoripare includendo EP viventi e fattori induttivi contemporaneamente durante la fabbricazione senza le limitazioni del tempo e delle condizioni della coltura. In particolare,

sono state osservate differenze significative tra la coltura cellulare a lungo termine in condizioni 2D e 3D. Questi risultati sottolineano ulteriormente l'importanza dell'architettura 3D nella differenziazione altamente efficiente delle cellule staminali. In particolare, il presente studio è il primo rapporto che la formazione morfologica del tessuto ghiandolare in vitro può essere promossa da costrutti stampati in 3D.

Tali risultati rappresentano una prima prova dell'organizzazione delle cellule ghiandolari a livello di tessuto avvenuta all'interno del costrutto bioprintato 3D in vitro e aprono la strada per un'ulteriore comprensione di un ruolo precedentemente sconosciuto dell'architettura porosa stampata in 3D nella fase di sviluppo del tessuto ghiandolare. Questa strategia auto-organizzante potrebbe aprire l'intrigante possibilità di rigenerare altri tessuti mediante manipolazioni microambientali in vitro del destino specifico delle cellule staminali, che sarebbero di particolare interesse per le applicazioni cliniche della tecnologia di bioprinting 3D. Inoltre, i dati di questo studio possono aiutare a raggiungere la riproducibilità e la standardizzazione nella bioprinting 3D per la medicina rigenerativa.

6.3 LE iPSC

Le iPSC (cellule staminali pluripotenti indotte) potrebbero essere il futuro dei modelli di pelle ingegnerizzati perché potenzialmente potrebbero essere differenziate in numeri illimitati di tutti i tipi di cellule della pelle [12]. Queste iPSC sono derivate da cellule somatiche adulte mediante riprogrammazione con espressione di fattori di riprogrammazione (ad esempio la combinazione di Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf4). L'espressione di questi fattori di riprogrammazione porta alla soppressione dei geni responsabili della differenziazione e all'espressione di geni e cambiamenti epigenetici che sostengono la pluripotenza, riportando le cellule a uno stato pluripotente. Sono stati sviluppati metodi di consegna sicuri dei fattori di riprogrammazione usando approcci privi di integrazione del genoma da retrovirus. Questi metodi senza integrazione possono essere utilizzati per ottenere iPSC di alta qualità, ma sono molto inefficienti rispetto ai metodi di integrazione virale. Anche la scelta del tipo di cellula somatica influenza l'efficienza della riprogrammazione. L'iPSC può essere generato da vari tessuti: pelle, tessuto adiposo, sangue cordonale, sangue periferico e urina. Dai tessuti della pelle, i cheratinociti, i melanociti, i fibroblasti e le cellule della papilla dermica possono essere utilizzati per generare iPSC [11].

Le iPSC possono essere differenziate in un'ampia varietà di cellule, inclusi cheratinociti, fibroblasti, melanociti, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce, portando al potenziale

utilizzo della pelle derivata da iPSC per applicazioni cliniche e modelli di pelle in vitro che imitano la pelle sana e malata in maniera molto migliore rispetto a quelle ottenute ad oggi. Il modello di pelle sana derivato da iPSC più semplice disponibile è un'epidermide ricostruita in vitro da cheratinociti derivati da iPSC [50]. Questo modello ha mostrato differenziazione, stratificazione e permeabilità della barriera simili rispetto al modello epidermico sano primario.

Gledhill et. al [51] hanno ulteriormente migliorato la complessità di questo modello introducendo melanociti derivati da iPSC in un'epidermide ricostruita su un derma popolato di fibroblasti. Questo modello di pelle 3D interamente derivato da iPSC ha mostrato morfologia, differenziazione e stratificazione simili rispetto al modello di pelle sana primaria. I melanociti funzionali derivati da iPSC localizzati nello strato basale dell'epidermide, estendevano i dendriti negli strati soprabasali dell'epidermide e producevano melanina, che poteva essere interiorizzata dai cheratinociti derivati dalle iPSC. Recentemente le cellule endoteliali derivate da iPSC sono state incorporate in un modello di pelle primaria umana in un dispositivo microfluidico [52]. Questo modello cutaneo perfuso mostrava una rete vascolare con una funzione di barriera endoteliale e una normale barriera cutanea. Il principale svantaggio del modello è che i cheratinociti e i fibroblasti non sono derivati da iPSC, ma mostra che è realizzabile aumentare la complessità dei modelli di pelle usando iPSC.

Il prossimo passo sarebbe quello di introdurre cellule immunitarie e appendici derivate da da iPSC nei modelli di pelle. È già stato dimostrato che le iPSC possono essere differenziate in cellule staminali ematopoietiche e nella loro progenie ed in diversi tipi di cellule immunitarie: Linfociti T, macrofagi, granulociti, eritrociti e cellule dendritiche. Yang et al. [53] che iPSC umani che sono stati differenziati in cellule staminali epiteliali che esprimono CD200 e ITGA6, sono in grado di generare tutti i lignaggi del follicolo pilifero nei topi, incluso il fusto del pelo. In combinazione con le cellule di papilla dermica umana, quando le cellule di papilla dermica possono essere generate da iPSC, queste cellule staminali epiteliali che esprimono CD200 e ITGA6 potrebbero in futuro essere utilizzate per costruire modelli di pelle in vitro derivati dalle iPSC completamente umani contenenti "follicoli piliferi".

Oltre a generare modelli di pelle umana sani, iPSC derivato da cellule somatiche contenenti una mutazione genetica può essere utilizzato per generare modelli di pelle con malattie genetiche. Già nel 2011, Itoh et. al [54] hanno differenziato iPSC derivato da pazienti con

epidermolisi bollosa distrofica recessiva (RDEB) in cheratinociti. Gli equivalenti cutanei 3D costruiti con i cheratinociti derivati da iPSC RDEB non hanno mostrato espressione del collagene VII in maniera simile alla cute dei pazienti con RDEB. Tali modelli di malattie della pelle possono essere usati come modello in vitro per studiare il meccanismo della malattia e/o per testare nuovi farmaci (specifici per il paziente). Inoltre, a causa della possibilità di isolare le iPSC dal sangue o dalle urine, si potrebbero realizzare modelli illimitati di malattie genetiche della pelle in vitro. Anche per i pazienti con una pelle donatrice sana limitata (ad es. ferite da ustioni di ampia superficie corporea), le iPSC da sangue o urina danno la possibilità di effettuare innesti cutanei autologhi illimitati. Tuttavia, sono necessarie ulteriori ricerche per determinare la stabilità e la sicurezza delle terapie derivate dalle iPSC.

Uno svantaggio dell'utilizzo delle iPSC è che la riprogrammazione e la successiva verifica della pluripotenza richiedono un lavoro manuale intenso, limitando il tempo di produzione, la scala e la riproducibilità. Di recente, tuttavia, è stata descritta la prima conversione ad alto rendimento di biopsie cutanee in iPSC e cellule differenziate con un intervento manuale minimo da parte di una piattaforma robotica [55]. Gli autori dimostrano che la selezione automatizzata può comportare iPSC di alta qualità, più controllati e stabili. Questa piattaforma robotica ha il potenziale per aumentare l'uso degli iPSC.

7 CONCLUSIONI

Il bioprinting è una tecnologia sviluppata dalla stampa 3D che consente la stampa simultanea di matrice extracellulare e cellule (bioink) per la rigenerazione di tessuti funzionali. Le fasi principali del processo di bioprinting sono l'imaging dell'architettura tissutale da costruire e progettare, la selezione di biomateriali e cellule appropriate e infine la stampa del costruito tissutale [6]. Il bioprinting cutaneo utilizza cellule, biomateriali e altri ingredienti attivi per produrre costrutti vitali in modo ben controllato ed ha sviluppato con successo sostituti cutanei multistrato in vitro e in vivo. Tuttavia, tali costrutti erano limitati da scarsa vascolarizzazione, mancanza di follicoli piliferi e altre appendici che sono necessari per la funzione della pelle e per l'estetica [9]. Per ovviare a questi difetti, vengono utilizzati segnali come stimoli meccanici/elettrici, nanoparticelle o fattori di crescita per imitare la nicchia naturale della pelle nativa nel costruito.

Uno sforzo collettivo che combina varie tecnologie e progressi come l'uso di polimeri conduttivi, nanocompositi, bioprinting 3D/4D e microfluidica contribuirà a realizzare la missione di una pelle bioprintata completamente funzionale. Questo potrebbe essere un approccio promettente per ottenere tessuti strutturalmente, funzionalmente ed esteticamente simili alla pelle intatta [3]. Inoltre, oltre alla necessità di standardizzazione tecnica e dei risultati, sono necessari rigorosi studi randomizzati controllati e dati di follow-up a lungo termine per determinare la potenza e il rischio oncologico.

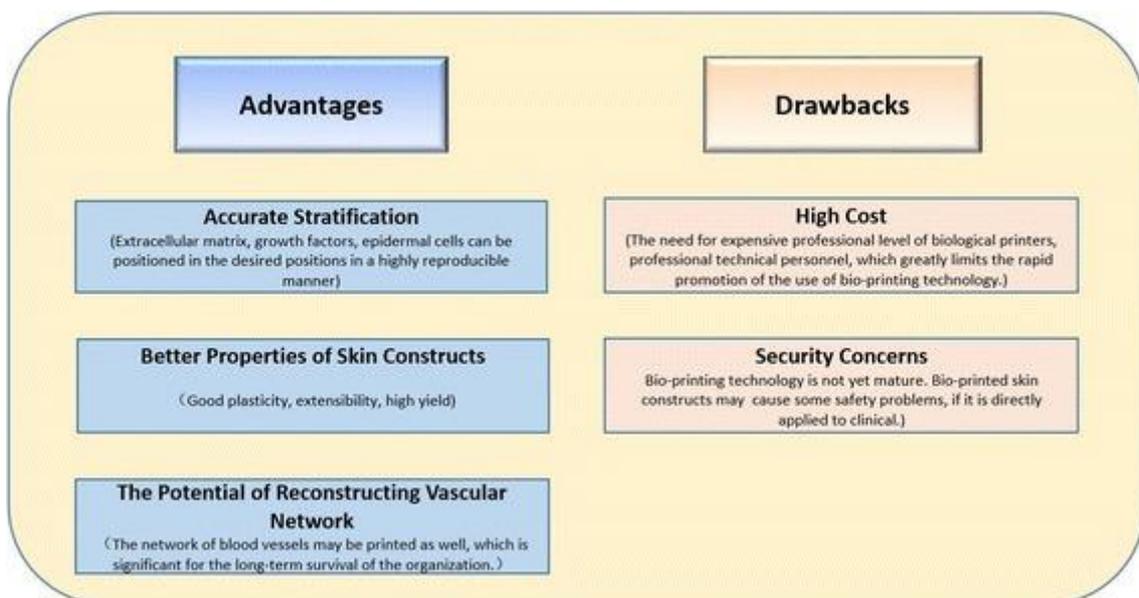


Fig.22: vantaggi e svantaggi dell'utilizzo della stampa 3D per la rigenerazione cutanea

La bioprinting permette una maggiore velocità di stampa ed una maggiore vitalità delle cellule rispetto alle tecniche tradizionali dell'ingegneria dei tessuti ed attualmente è la tecnica che permette di ottenere la massima velocità di stampa per rifabbricare strutture complesse. Ha inoltre il potenziale per affrontare l'urgente necessità di costrutti cutanei per innesto in clinica. La ricerca futura dovrebbe concentrarsi sulla generazione di costrutti della pelle utilizzando tecnologie sempre più innovative di bioprinting. I costrutti della pelle 3D stampati da una miscela di cellule, collageni e idrogel forniscono strutture con funzioni limitate. Come migliorare la costruzione e la funzione di queste strutture rimane tuttora una sfida.

Per una corretta applicazione dei sostituti cutanei in clinica, è essenziale ridurre i tempi di preparazione per i costrutti tramite bioprinting. L'applicazione tempestiva di costrutti cutanei stampati tramite bioprinting potrebbe aumentare il tasso di recupero e ridurre il tessuto cicatriziale ipertrofico [5]. Per curare un paziente gravemente ustionato, i costi finanziari saranno ostacoli al recupero delle ustioni [3]. È stato riferito che il costo medico totale medio per paziente ustionato nei paesi ad alto reddito è \$ 88.218 [4]. Il costo della bioprinting 3D include principalmente la coltura cellulare prima della stampa, la stampa biologica, la coltura di stampa, i costi operativi ecc. Pertanto, il costo si ridurrà se la procedura di bioprinting è matura e riduce il tasso di fallimento. Finora, il bioprinting cutaneo è poco usato nella ricerca, quindi è difficile calcolare il costo di questa tecnica in clinica. Tuttavia, gli specialisti si aspettano il suo utilizzo in un futuro molto vicino.

Sebbene la struttura della pelle stampata in 3D con la replica completa della pelle nativa non sia ancora stata raggiunta, lo stato attuale della bioprinting della pelle in diversi aspetti critici (dalla fase di pre-elaborazione alla valutazione del prodotto finale) ha mostrato risultati promettenti per la creazione di equivalenti funzionali della pelle [3].

Le strade verso la crescente complessità dei modelli per includere la vascolarizzazione hanno il potenziale per migliorare l'autenticità della pelle e le previsioni sulla biodisponibilità del farmaco cutaneo in vitro. Per quanto riguarda le applicazioni nel trapianto, sostituti della pelle a doppio strato stampati in 3D sono stati impiantati con successo nel modello di topi immunodeficienti [8]. C'è inoltre una grande richiesta per l'uso della pelle artificiale per i test sui cosmetici.

Sebbene la bioprinting della pelle abbia mostrato delle promesse nella creazione di un equivalente funzionale della pelle in termini di aspetti di cui sopra, ci sono ancora limitazioni e sfide che devono essere superate. In termini di aspetti cellulari, la funzionalità della pelle stampata può essere migliorata introducendo più tipi di cellule e numeri di cellule, tuttavia, la generazione di reti vascolari, recettori sensoriali e appendici all'interno del costrutto cutaneo in maniera standardizzata e ripetibile è ancora una sfida. L'uso di cellule staminali può essere un'alternativa per risolvere il problema [12], ma i potenziali rischi di effetti avversi a lungo termine dovrebbero essere ulteriormente studiati. In termini di materiali, la maggior parte della pelle stampata utilizzava il collagene di tipo I come matrice di supporto, mentre il restringimento è un problema comune per questo tipo di materiale [1]. La combinazione di scaffold a maglie polimeriche (ad es. PCL) con collagene potrebbe impedire il restringimento. Tuttavia, il lungo tempo di degradazione della PCL può ostacolare la sua applicazione nell'impianto cutaneo. In termini di processo di progettazione, poiché la pelle nativa è anatomicamente eterogenea, i nuovi approcci di progettazione associati ai processi di bioprinting dovrebbero essere ulteriormente sviluppati al fine di rappresentare l'eterogeneità dei costrutti della pelle [3].

In termini di processo di bioprinting, ogni tecnica di bioprinting ha i suoi vantaggi e limiti. Un sistema ibrido di due o più metodi di bioprinting potrebbe essere la soluzione per superare le sfide nel bioprinting della pelle. In termini di post-elaborazione, l'introduzione di più tipi di cellule aumenta la difficoltà di co-coltura cellulare a causa della sfida nel bilanciare la proliferazione e la differenziazione di vari tipi di cellule. Sono inoltre necessarie proprietà biomeccaniche del tessuto della pelle stampato compatibile con l'ambiente di coltura, soprattutto quando la post-costruzione è in una condizione di coltura dinamica. In termini di aspetti applicativi, esiste ancora una certa distanza tra gli attuali costrutti cutanei stampati e la pelle nativa, pertanto sono necessari maggiori sforzi per sviluppare sostituti cutanei artificiali perfettamente funzionanti, specialmente se usati come modello in vitro nell'area di rilascio dei farmaci. Vi sono anche altre barriere etiche, normative e sociali associate alla bioprinting che devono essere affrontate. Le strette collaborazioni tra le aree multidisciplinari alla fine trasformeranno in realtà la bioprinting 3D del tessuto cutaneo umano.

La sfida più critica è la necessità di costruire una pelle di grandi dimensioni con vascolarizzazione altamente sviluppata. L'anastomosi dei vasi sanguigni è fondamentale per la sopravvivenza a lungo termine del costrutto dopo l'impianto. Ridurre il periodo tra la fase iniziale post-impianto e l'angiogenesi è una sfida fondamentale da affrontare. Questo

è un periodo decisivo che determinerà il successo di ogni innesto che viene impiantato nel corpo. È molto importante mantenere lo spessore e la consistenza degli strati epidermici, dermici e ipodermici della pelle bioprintata in modo da abbinarli alla pelle nativa del paziente. Costrutti della pelle contenenti strutture funzionali multiple come ghiandole sudoripare, follicoli piliferi, ghiandole sebacee sono ancora un requisito difficile da raggiungere ma molto importanti. In futuro, è molto importante progettare la pelle perfettamente funzionale mediante bioprinting di tali strutture in modo da ricreare l'anatomia e la fisiologia native della pelle e dei tessuti circostanti. Sono anche molto importanti il mantenimento di proprietà meccaniche ottimali, un'adeguata riassorbibilità dei biomateriali nella struttura, la sostituzione mediante rimodellamento, la popolazione con le cellule viventi, l'integrazione con il tessuto ospite e la scomparsa a lungo termine del sostituto.

Il bioprinting cutaneo ha le grandi opportunità di costruire complessi costrutti di tessuto necessari per correggere complicati difetti della pelle che sono difficili da curare con le normali procedure cliniche. L'obiettivo finale della tecnologia di bioprinting è la costruzione di una pelle completamente funzionale equivalente con canali vascolari e tutte le appendici necessarie (follicoli piliferi, ghiandole sudoripare, ghiandole sebacee) mediante la stampa simultanea di cellule e altri agenti, successivamente trapiantati e anastomizzati con circolazione sanguigna nativa. Ci sono molti gap ancora da colmare per completare questa missione. Al fine di facilitare la traduzione clinica della bioprinting, è stato sviluppato un dispositivo portatile (Biopen) per la bioprinting intraoperatoria [56]. Si tratta di un dispositivo portatile in grado di stampare idrogel, biomateriali e cellule staminali primarie umane con elevata vitalità.

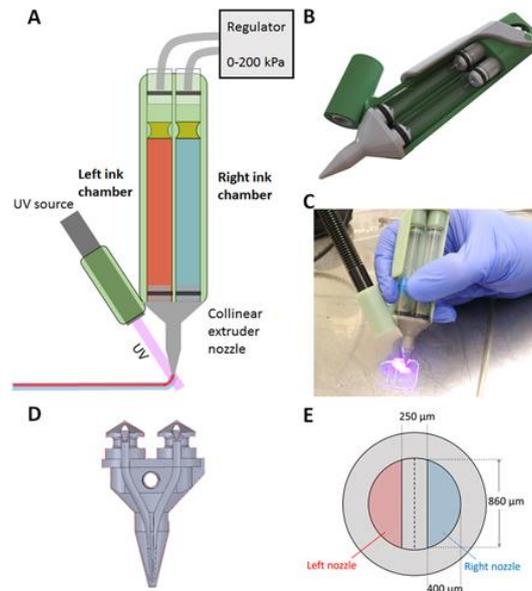


Fig. 23: (A) Schema della biopen. Il sistema pneumatico controlla l'estrusione attraverso due camere di inchiostro (sinistra e destra) in modo indipendente. L'estrusione viene attivata tramite due pedali collegati ai regolatori di pressione. Il sistema di polimerizzazione UV viene attivato tramite un terzo pedale. (B) Modello CAD 3D che mostra i componenti stampati in 3D della biopen. (C) Fotografia della biopen utilizzata per tracciare linee indurite UV di un idrogel metacrilato su un vetrino, illustrando il fattore di forma ridotto del dispositivo. (D) Modello CAD dell'ugello di estrusione collineare e (E) sezione trasversale della punta di estrusione.

Gli ugelli in titanio sono stati fabbricati per consentire la stampa di più inchiostri in una geometria collineare (side-by-side). La pressione di estrusione applicata in modo indipendente per entrambe le camere consente il controllo geometrico della struttura stampata e la creazione di gradienti compositivi. La biopen può anche essere utilizzata per incapsulare e rilasciare cellule staminali umane primarie, con cellule staminali adipose umane che dimostrano un'elevata vitalità (> 97%) dopo la stampa con biopen. La natura modulare del dispositivo consente anche la commutazione facile e rapida di formulazioni di inchiostro o geometrie di stampa. La biopen è in grado di stampare una ampia gamma di materiali (con viscosità inferiore a 1 Pa.s fino ad almeno 100 Pa.s. Attraverso un'adeguata scelta del materiale, la biopen può anche essere utilizzata per costruire strutture 3D in scala da mm a cm.

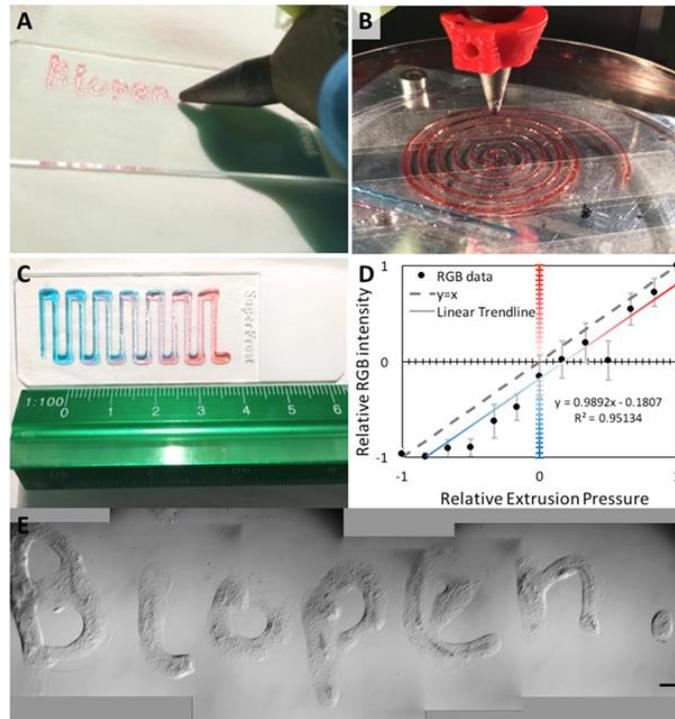


Fig.24: dimostrazioni della capacità di stampa biopen. (A) Stampa manuale di un inchiostro a base di idrogel (GelMa 10%) etichettato con un colorante rosso su un vetrino. (B) Stampa robotizzata di una spirale nello stesso inchiostro di idrogel colorato su una capsula di Petri in PET. L'uniformità della spirale illustra la consistenza della stampa. (C) Un gradiente blu-rosso creato controllando le velocità di estrusione relative delle camere di inchiostro sinistra e destra. Ogni camera di inchiostro conteneva la soluzione GelMa al 10% tinta di blu (ugello sinistro) o rosso (ugello destro). (D) Analisi dell'immagine del gradiente stampato. L'asse x mostra la pressione di estrusione relativa tra l'ugello "sinistro" (contenente l'inchiostro blu) e l'ugello "destro" (contenente l'inchiostro rosso). L'asse y mostra il colore rosso o blu relativo delle linee stampate (come ottenuto dall'intensità RGB). Il colore relativo è linearmente proporzionale alla pressione di estrusione relativa, come mostrato dalla linea di tendenza. La linea di tendenza viene spostata rispetto alla relazione $y = x$ ideale, probabilmente a causa dell'asimmetria nelle velocità di stampa tra gli ugelli sinistro e destro (come mostrato nella figura 4 (B)). (E) Mosaico di cinque immagini al microscopio ottico che mostrano la parola scritta a mano 'Biopen' da (A) sopra. Barra della scala 400 μm .

Alcune limitazioni all'attuale design della biopen: (i) il diametro esterno della punta dell'ugello dell'estrusore ($\sim 1 \text{ mm}$) pone un limite alla dimensione più piccola del difetto che potrebbe essere risolto da questo dispositivo, mentre l'attuale risoluzione di stampa pone un ulteriore limite alla complessità delle cellule depositate chirurgicamente. (ii) Il calore della mano dell'utente mentre si tiene la biopen disturba l'equilibrio termico, che a sua volta modifica la velocità di stampa. Ciò significa che sono necessarie regolazioni della pressione di estrusione per mantenere un flusso volumetrico coerente.

Nel prossimo futuro tali strumenti potrebbero trovare applicazioni come la deposizione precisa di cellule nelle ferite insieme a biopolimeri in clinica. Un altro possibile progresso rivoluzionario sarà la stampa 4D che maturerà gradualmente in bioprinting 4D [3]. I materiali intelligenti che rispondono agli stimoli potrebbero anche fornire proprietà speciali come la memoria della forma per i costrutti della pelle bioprintati.

8 REFERENZE

- [1] Atul A. Chaudhari et al., Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review, International Journal of Molecular Medicine, Dec.2016
- [2] Wei Long Ng et al., Proof-of-concept: 3D bioprinting of pigmented human skin constructs, International Society of Biofabrication, IOP Science, Jan 2018
- [3] Wei-Cheng Yan et al., 3D bioprinting of skin tissue: From pre-processing to final product evaluation, Advanced Drug Delivery Review, July 2018, pp. 270-295
- [4] Varkey et al., Skin bioprinting: the future of burn wound reconstruction?, Burns & trauma, Oxford University Press, Feb. 2019
- [5] Matthew J. Randall et al., Advances in the Biofabrication of 3D Skin in vitro: Healthy and Pathological Models, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, Oct. 2018
- [6] Tarassoli et al., Skin tissue engineering using 3D bioprinting: An evolving research field, Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery, May 2018, pp. 615-623
- [7] Peng He et al., Bioprinting of Skin Constructs for Wound Healing, Burns & trauma, Oxford University Press, Jan 2018
- [8] Robin Augustine, Skin bioprinting: a novel approach for creating artificial skin from synthetic and natural building blocks, Springer Open, Progress in Biomaterials, May 2018
- [9] Vivian Lee et al., Design and Fabrication of Human Skin by Three-Dimensional Bioprinting, Tissue Engineering Part. C, Methods, Jun. 2014
- [10] S. Vijayavenkataraman et al., 3D bioprinting of skin: a state-of-the-art review on modelling, materials, and processes, International Society of Biofabrication, IOP Science, Sept. 2016
- [11] Lenie J. van den Broek et al., Progress and Future Prospectives in Skin-on-Chip Development with Emphasis on the use of Different Cell Types and Technical Challenges, Stem Cell
- [12] Sara Romanazzo et al., iPSC Bioprinting: Where are We at?, Materials, Aug. 2019
- [13] Robert K. Mlosek et al., Ultrasound image of the skin, apparatus and imaging basics, Journal of Ultrasonography, Jun. 2013 Reviews, Springer, May 2017 Rostislav

- [14] V. Shevchenko et al., A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction, *Interface*, The Royal Society Publishing, Feb. 2010
- [15] Peijun Gong, Parametric imaging of attenuation by optical coherence tomography: review of models, methods, and clinical translation, *Journal of Biomedical Optics*, Apr. 2020
- [16] Christian O. Duncan, In vitro transfer of keratinocytes: Comparison of transfer from fibrin membrane and delivery by aerosol spray, *Journal of Biomedical Material Research*, Mar 2015, pp. 221-228
- [17] Black et al., In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent, *FASEB Journal*, Oct. 1998
- [18] Deepti Singh, 3D Printing of Scaffold for Cells Delivery: Advances in Skin Tissue Engineering, *Polymers (Basel)*, Jan 2016
- [19] Xu et al., Fluid and cell behaviors along a 3D printed alginate/gelatin/fibrin channel, *Biotechnology and Bioengineering*, Mar. 2015
- [20] Tonghe Zhu et al., Regulating Preparation Of Functional Alginate-Chitosan Three-Dimensional Scaffold For Skin Tissue Engineering, *International Journal of Nanomedicine*, Nov. 2019
- [21] Vidal et al., 3D Biomaterial Matrix to Support Long Term, Full Thickness, Immunocompetent Human Skin Equivalents with Nervous System Components, *Biomaterials*, Apr. 2018
- [22] Schuurmaet al., Bioprinting of hybrid tissue constructs with tailorable mechanical properties, *Biofabrication*, Jun 2011
- [23] Léa J. Pourchet, Human Skin 3D Bioprinting Using Scaffold-Free Approach, *Advanced Healthcare Materials*, Wiley, Dec. 2016
- [24] Yuan Liu et al., In Vitro Construction of Scaffold-Free Bilayered Tissue-Engineered Skin Containing Capillary Networks, *BioMed Research International*, Mar. 2013
- [25] Patrick Scott Thayer et al., Bioprinting of Cartilage and Skin Tissue Analogs Utilizing a Novel Passive Mixing Unit Technique for Bioink Precellularization, *Journal of Visualized Experiments*, Jan. 2018
- [26] Xiaoying Zhang et al., Tissue engineering Applications of Three-Dimensional Bioprinting, *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2015, pp. 777-782

- [27] Hemanth Gudapati et al., Alginate gelation-induced cell death during laser-assisted cell printing *Biofabrication*, Aug. 2014
- [28] Walters et al., Strategies for Directing the Structure and Function of 3D Collagen Biomaterials across Length Scales, Brandan D. *Acta Biomaterials*, Apr. 2014, pp. 1488-1501
- [29] Gasperini et al., An electrohydrodynamic bioprinter for alginate hydrogels containing living cells, *Tissue Engineering Part C Methods*, 2014, p. 123
- [30] Kim et al., Direct 3D cell-printing of human skin with functional transwell system, *Biofabrication*, 2017
- [31] L. Koch et al., Laser printing of skin cells and human stem cells, *Tissue Engineering Part C Methods*, Oct. 2010
- [32] L. Koch et al., Skin tissue generation by laser cell printing, *Biotechnology and Bioengineering*, Jan. 2012
- [33] Stephanie Michael et al., Tissue Engineered Skin Substitutes Created by Laser-Assisted Bioprinting Form Skin-Like Structures in the Dorsal Skin Fold Chamber in Mice, *Plos One*, Mar. 2013
- [34] Binder et al., In Situ Bioprinting of Autologous Skin Cells Accelerates Wound Healing of Extensive Excisional Full-Thickness Wounds, *Scientific Reports*, Feb. 2019
- [35] Lee et al., Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication, *Biomaterials*, 2009, pp. 1587
- [36] Rimann et al., Standardized 3D bioprinting of soft tissue models with human primary cells, *Sage Journals*, Aug. 2016, pp. 496
- [37] Daejin Min et al., Bioprinting of biomimetic skin containing melanocytes, *Experimental Dermatology*, Apr. 2017
- [38] Nieves Cubo et al., 3D bioprinting of functional human skin: production and in vivo analysis, *Biofabrication*, Dec. 2016
- [39] S. Llames et al., Clinical results of an autologous engineered skin, *Cell Tissue Bank*, 2006, pp. 47-56
- [40] S. Llames, Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin, *Transplantation*, pp. 350–355

- [41] Huang et al., 3D bioprinted extracellular matrix mimics facilitate directed differentiation of epithelial progenitors for sweat gland regeneration, *Acta Biomaterials*, 2016, pp. 170
- [42] H. W. Kang et al., A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue construct with structural integrity, *Natural Biotechnology*, 2016, p.312
- [43] Zhao et al., Cell infiltrative hydrogel fibrous scaffolds for accelerated wound healing, *Acta Biomaterials*, Feb. 2017, p. 66-77
- [44] Si Xiong et al., A Gelatin-sulfonated Silk Composite Scaffold based on 3D Printing Technology Enhances Skin Regeneration by Stimulating Epidermal Growth and Dermal Neovascularization, *Scientific Reports*, Jun. 2017
- [45] Shepherd et al., Vascularization and engraftment of a human skin substitute using circulating progenitor cell-derived endothelial cells, *FASEB J.*, Aug. 2006
- [46] A. Monfort et al., Production of human tissue-engineered skin trilayer on a plasma-based hypodermis., *J Tissue Eng. Regen Med.*, Jun. 2103
- [47] Kosten et al., MUTZ-3 derived Langerhans cells in human skin equivalents show differential migration and phenotypic plasticity after allergen or irritant exposure, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2015
- [48] Groeber F. et al., A first vascularized skin equivalent for as an alternative to animal experimentation, *ALTEX.*, 2016, pp. 415–422
- [49] Liu N. et al., 3D bioprinting matrices with controlled pore structure and release function guide in vitro self-organization of sweat gland., *Scientific Reports.*, 2016
- [50] Petrova A. et al., Induced pluripotent stem cell differentiation and three-dimensional tissue formation attenuate clonal epigenetic differences in Trichohyalin, *Stem Cells and Development*, 2016, pp. 1366–1375
- [51] Petrova A. et al., 3D in vitro model of a functional epidermal permeability barrier from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cell, *Stem Cell Reports.*, 2014, pp. 675–689.
- [52] Abaci HE et al., Human skin constructs with spatially controlled vasculature using primary and iPSC-derived endothelial cells, *Advanced Healthcare Materials*, 2016
- [53] Yang R. et al., Generation of folliculogenic human epithelial stem cells from induced pluripotent stem cells., *Nature Communications*, 2014

[54] Itoh M. et al., Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011

[55] Paul D. et al., Automated, high-throughput derivation, characterization and differentiation of induced pluripotent stem cells., Nature Methods., 2015, pp. 885–892

[56] D. O'Connell, Development of the Biopen: A Handheld Device for Surgical Printing of Adipose Stem Cells at a Chondral Wound Site, Cathal Biofabrication, Mar. 2016